

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

**THÈSE DE RECHERCHE PRÉSENTÉE À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À TROIS-RIVIÈRES**

**COMME EXIGENCE PARTIELLE
DU DOCTORAT EN BIOPHYSIQUE ET BIOLOGIE CELLULAIRES**

**PAR
VÉRONIQUE GAGNON**

**RÉSISTANCE AUX AGENTS CHIMIOTHÉRAPEUTIQUES ET IMPLICATION
DES INHIBITEURS D'APOPTOSE CHEZ LES CELLULES CANCÉREUSES
UTÉRINES HUMAINES : RÔLE DE LA VOIE DE SURVIE AKT**

DÉCEMBRE 2007

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

À la mémoire de Frédéric Gagnon

RÉSUMÉ

Le cancer est à l'heure actuelle la première cause de mortalité au Canada, surpassant ainsi les maladies cardiovasculaires. Au premier rang chez la femme, notons la présence du cancer du sein suivie par le cancer du poumon, du colon et de l'endomètre. Lors d'un cancer de l'endomètre, la femme peut avoir recours à la chirurgie, à la radiothérapie, à l'hormonothérapie et à la chimiothérapie. Dans ce cas, les agents chimiothérapeutiques les plus souvent utilisés sont le cisplatine, la doxorubicine et le taxol. Cependant, leur taux de réponse atteint seulement 35% pour les trois agents, ce qui démontre l'importance de la résistance aux drogues. Ainsi, les mécanismes conduisant à la chimiorésistance doivent à tout prix être élucidés afin d'augmenter le taux de survie des femmes atteintes de cette terrible maladie. L'objectif de cette étude est de déterminer l'implication possible de la protéine Akt dans l'induction de l'expression de protéines inhibitrices d'apoptose et lors de la résistance au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol chez les cellules du cancer de l'endomètre humain. Pour cette étude, nous avons utilisé une lignée du cancer du col de l'utérus (HeLa), deux lignées du cancer de l'endomètre (HEC-1-A et KLE) ayant la protéine PTEN à l'état sauvage et deux lignées du cancer de l'endomètre (RL-95-2 et Ishikawa) démontrant une mutation inactivant la protéine PTEN. À l'aide des traitements avec la Wortmannin et des transfections avec un plasmide exprimant Akt de façon constitutive (AktCA), nous avons révélé pour la première fois que la protéine Akt induit l'expression d'une protéine inhibitrice d'apoptose : cIAP-1. De plus, nous avons démontré que les cellules KLE expriment de hauts niveaux des isoformes Akt1, Akt2 et Akt3, de même que de leur phosphorylation, et sont résistantes au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol. Les transfections avec les vecteurs d'expression Akt1CA, Akt2CA ou Akt3CA, nous ont également permis de démontrer pour la première fois que les isoformes de la protéine Akt peuvent agir différemment au niveau de la résistance à la doxorubicine. En fait, Akt2 et Akt3 seulement induisent la résistance à la doxorubicine chez les cellules HeLa, tandis que l'augmentation de l'activité de tous les isoformes de Akt conduit à la résistance au taxol chez cette même lignée cellulaire. Bien que l'augmentation des niveaux de phosphorylation de tous les isoformes de Akt ne permet pas d'induire la

résistance au cisplatine chez les cellules HeLa, une diminution de deux isoformes, Akt1 et Akt2, de façon simultanée permet d'augmenter le pouvoir apoptotique du cisplatine chez les cellules résistantes à cette drogue, comme les cellules KLE. De plus, les traitements au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol diminuent les niveaux de XIAP chez les cellules HeLa. Ainsi, une diminution de la protéine XIAP à l'aide de la technique siRNA augmente la toxicité du cisplatine chez les cellules KLE, mais n'engendre aucun effet au niveau de la résistance à la doxorubicine et au taxol. L'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines permet l'activation de Akt chez les cellules HeLa, ce qui se traduit par une induction de la résistance au taxol. De plus, l'inhibition de ces mêmes phosphatases augmente la phosphorylation de Akt1 et/ou Akt3 chez les cellules KLE accompagnée d'une augmentation de la résistance à la doxorubicine. Chez les cellules Ishikawa, l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines n'engendre aucun effet au niveau de la phosphorylation de Akt, mais conduit tout de même l'apparition du caractère de résistance au cisplatine et à la doxorubicine. Cette étude démontre donc que la résistance aux agents chimiothérapeutiques rencontrée lors d'un cancer de l'endomètre peut être induite par différentes protéines tout dépendant de la lignée cellulaire étudiée. Il reste donc maintenant à trouver une drogue qui saura outre-passer ces mécanismes de résistance.

REMERCIEMENTS

En tout premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de recherche Eric Asselin. Ton amour de la recherche est si intense que tu as su m'en transmettre une partie. Merci également pour tes nombreuses idées, elles m'ont permis de me rendre au bout de mes recherches tout en gardant mille et une nouvelles idées. Merci pour tes encouragements qui furent très appréciés lors des moments difficiles. Malgré nos différences d'opinion, je crois que nous avons toujours su tirer le meilleur de nous, ce qui nous a permis de faire une équipe merveilleuse. Continue sur ce beau chemin et de nombreux étudiants comme moi n'auront de mots pour te remercier à ta juste valeur.

Je tiens également à te remercier, Sophie Parent, pour ta patience et ta douceur. Au fil des ans, tu m'as transmis tes connaissances et fait de moi une passionnée de laboratoire. En fait, je pourrais même te dire, Sophie, que tu es devenue mon idéal féminin, grâce à la passion que tu dégages face à ce que tu entreprends, que ce soit au niveau professionnel ou familial. J'espère un jour parvenir à atteindre un si bel équilibre. Une autre personne dans le laboratoire qui fût très importante pour moi est Valérie Leblanc. Je te remercie pour toute l'aide apporter durant les deux dernières années. Grâce à ton amitié et ton sens de l'humour, nous avons fait une équipe formidable et je ne l'oublierais jamais. Un gros merci à tous ceux qui ont fréquenté le laboratoire durant ses nombreuses années, particulièrement à Marie-Claude Déry pour son amitié et ses blagues qui nous ont tous permis un moment de détente, à Céline Van Themshe pour son sens critique et ses nouvelles idées, et à Steve Turner, à qui je souhaite de superbes résultats qui lui permettront de continuer en beauté ce merveilleux projet.

Je voudrais également remercier mes parents pour tout l'encouragement qu'ils m'ont apporté. Ils ont toujours cru en moi et je leur en suis totalement reconnaissante. Enfin, je ne pourrais terminer sans remercier mon amour, Daniel. Mille mercis pour tes encouragements et ton sens critique qui m'ont permis de persévérer et d'arriver où j'en suis aujourd'hui. Profitons maintenant du temps que nous pouvons passer ensemble.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	vi
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS	xv
CHAPITRE I REVUE DE LITTÉRATURE	1
1. INTRODUCTION	2
1.1 Problématique	2
1.2 Le développement d'un cancer	2
1.2.1 Généralités	2
1.2.2 Les événements génétiques causant l'apparition d'une tumeur maligne	3
1.2.2.1 Les oncogènes	4
1.2.2.2 Les gènes suppresseurs de tumeur	5
1.3 La mort cellulaire par apoptose	5
1.3.1 Généralités	5
1.3.2 Le cycle cellulaire	6
1.3.3 L'induction de l'apoptose	7
1.3.3.1 La famille des Bcl-2	8
1.3.3.2 La famille des caspases	9
1.3.3.3 La voie intrinsèque de l'apoptose	12
1.3.3.4 La voie extrinsèque de l'apoptose	13
1.4 La voie de survie du phosphatidylinosol 3-Kinase (PI 3-K)	14
1.4.1 Généralités	14
1.4.2 Les classes de PI 3-K	14
1.4.3 L'inhibition de PI 3-K	17
1.5 Akt/PKB/Rac et ses isoformes	18
1.5.1 Généralités	18
1.5.2 Les différents isoformes de Akt	18

1.5.3 Différences rencontrées chez les souris déficientes en Akt1, Akt2 ou Akt3 ..	20
1.5.4 Les mécanismes d'activation de Akt	21
1.5.5 Les fonctions cellulaires de Akt	22
1.6 Le gène suppresseur de tumeur : PTEN	23
1.6.1 La structure du gène PTEN	23
1.6.2 Les fonctions biologiques de PTEN	26
1.7 Les inhibiteurs d'apoptose (IAPs).....	26
1.7.1 Caractéristiques des membres de la famille des IAPs	26
1.7.2 L'inhibition des IAPs	28
1.7.3 Le rôle des IAPs	29
1.7.3.1 XIAP	29
1.7.3.2 cIAP-1 et cIAP-2	29
1.7.3.3 NAIP	30
1.7.3.4 ILP-2	30
1.7.3.5 Livin	30
1.7.3.6 Survivin	31
1.7.3.7 BRUCE	31
1.8 Les phosphatases tyrosines et alcalines	32
1.8.1 Généralités	32
1.8.2 La phosphorylation des tyrosines	32
1.8.2.1 Les familles de PTPs	33
1.8.2.1.1 Classe I : Les PTPs classiques	34
1.8.2.1.2 Classe II : Les phosphatases à double spécificité	35
1.8.2.1.3 Classe III : Les phosphatases à faible poids moléculaire	36
1.8.2.1.4 Classe IV : Les Eya	37
1.8.3 Les phosphatases alcalines et acides	37
1.9 La physiologie utérine	38
1.9.1 Généralités	38
1.9.2 Le cycle menstruel	40
1.10 Le cancer de l'utérus	41
1.10.1 Généralités.....	41

1.10.2 L'étiologie et les facteurs de risque	43
1.10.3 Les manifestations et le diagnostique	44
1.10.4 La stadification	45
1.10.5 Les traitements	46
1.10.5 Généralités.....	46
1.10.5.2 Le cisplatine	47
1.10.5.3 La doxorubicine	50
1.10.5.4 Le taxol (paclitaxel)	52
1.10.5.5 Akt et la chimiorésistance	55
1.10.5.6 XIAP et la chimiorésistance	57
1.11 Les objectifs	58

CHAPITRE II AKT ACTIVITY IN ENDOMETRIAL CANCER CELLS: REGULATION OF CELL SURVIVAL THROUGH CIAP-1 59

2.1 Préface	60
2.2 Résumé de l'article	61
2.3 Abstract	63
2.4 Introduction	64
2.5 Materials and methods	65
2.6 Results	69
2.7 Discussion	71
2.8 References	74
2.9 Figure legends	78
2.10 Figures	81

CHAPITRE III AKT INVOLVEMENT IN CISPLATIN CHEMORESISTANCE OF HUMAN UTERINE CANCER CELLS 88

3.1 Préface	89
3.2 Résumé de l'article	90
3.3 Abstract	92
3.4 Introduction	93
3.5 Materials and methods	95

3.6 Results	98
3.7 Discussion	100
3.8 References	104
3.9 Figure legends	108
3.10 Figures	111
 CHAPITRE IV AKT AND XIAP REGULATE THE SENSITIVITY OF HUMAN UTERINE CANCER CELLS TO CISPLATIN, DOXORUBICIN AND TAXOL	 118
4.1 Préface	119
4.2 Résumé de l'article	120
4.3 Abstract	122
4.4 Introduction	123
4.5 Materials and methods	124
4.6 Results	128
4.7 Discussion	131
4.8 References	136
4.9 Figure legends	140
4.10 Figures	143
 CHAPITRE V INHIBITION OF TYROSINE AND ALKALINE PHOSPHATASES IN HUMAN ENDOMETRIAL CANCER CELLS.....	 150
5.1 Préface	151
5.2 Résumé de l'article	152
5.3 Abstract	154
5.4 Introduction	155
5.5 Materials and methods	157
5.6 Results	159
5.7 Discussion	160
5.8 References	165
5.9 Figure legends	169
5.10 Figures	171

CHAPITRE VI	DISCUSSION GÉNÉRALE	174
6.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES FUTURES	175
6.1	Implication de la protéine Akt dans la régulation de protéines inhibitrices d'apoptose	175
6.2	Expression de la protéine Akt et son activation chez les cellules cancéreuses utérines humaines	179
6.3	La résistance aux agents chimiothérapeutiques chez les cellules cancéreuses utérine humaines	185
6.4	Akt et la résistance aux drogues chez les cellules cancéreuses utérines humaines	189
6.5	La phosphorylation de Akt observée à différents grades du cancer de l'endomètre	191
6.6	Les protéines inhibitrices d'apoptose et la résistance aux drogues chez les cellules cancéreuses utérines humaines	194
6.7	L'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines chez les cellules cancéreuses utérines humaines et la résistance aux agents chimiothérapeutiques	197
6.8	La liaison 17 β -oestradiol-cisplatine une combinaison gagnante pour les cellules du cancer de l'endomètre résistantes au cisplatine	201
6.9	Conclusion	202
BIBLIOGRAPHIE		205
ANNEXE		250

LISTE DES FIGURES

1.1	Stade de prolifération maligne et d'invasion métastatique	3
1.2	Le cycle cellulaire	6
1.3	Voie de signalisation menant à l'apoptose	9
1.4	Structure des gènes des caspases initiatrices et effectrices	11
1.5	Voie de signalisation simplifiée de PI 3-K/Akt	16
1.6	Domaines fonctionnels des trois isoformes de la protéine Akt chez l'humain	19
1.7	Structure du gène suppresseur de tumeur PTEN.....	24
1.8	Phénomènes génétiques menant à l'apparition d'un cancer de l'endomètre	25
1.9	Les différents membres de la famille des IAPs	27
1.10	Représentation schématique de quelques PTPs classiques	35
1.11	Anatomie de l'utérus	39
1.12	Cycle menstruel chez la femme	40
1.13	Altération de certains gènes lors d'un cancer de l'endomètre	42
1.14	Coupe histologique de carcinomes endométrioides de l'utérus de grade I (a) et grade III (b)	43
1.15	Mécanisme d'activation du cisplatine	48
1.16	Liaison du cisplatine avec les différents acides nucléiques des brins d'ADN.....	48
1.17	Structure de la doxorubicine	51
1.18	Structure du taxol	53
2.1	Expression of mRNA genes	81
2.2	Protein expression and Akt phosphorylation	82
2.3	Inhibitor of apoptosis protein expression	83
2.4	Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in HEC-1-A cells	84

2.5	Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in RL-95-2 cells	85
2.6	Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in Ishikawa cells	86
2.7	Effect of constitutively active Akt on cIAP-1 protein expression	87
3.1	Expression of mRNA genes	111
3.2	Protein expression and Akt phosphorylation	112
3.3	Effect of LY294002 on apoptosis in HeLa cells	113
3.4	Effect of LY294002 on apoptosis in HEC-1-A cells	114
3.5	Effect of LY294002 on apoptosis in KLE cells	115
3.6	Influence of cisplatin on cell proliferation	116
3.7	siRNA Akt down-regulation effect on cisplatin-induced apoptosis in KLE cells	117
4.1	Differential sensitivity of uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol	143
4.2	Chemotherapeutic drugs decrease Akt phosphorylation and XIAP content in P-Akt negative cells	144
4.3	Overexpression individual Akt isoforms does not increase resistance of HeLa cells to cisplatin-induced apoptosis	145
4.4	Overexpressing constitutively active Akt2 or Akt3 increases the resistance of HeLa cells to doxorubicin-induced apoptosis	146
4.5	Overexpressing constitutively active Akt1, Akt2 or Akt3 increases the resistance of HeLa cells to taxol-induced apoptosis	147
4.6	XIAP protects uterine cancer cells from cisplatin	148
4.7	Akt is phosphorylated in human endometrial carcinoma cells <i>in vivo</i>	149
5.1	Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced apoptosis in HeLa cells	171
5.2	Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced apoptosis in KLE cells	172

5.3	Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced apoptosis in Ishikawa cells	173
-----	--	-----

LISTE DES TABLEAUX

1.1 Les différents stades du cancer de l'endomètre	46
6.1 Caractéristiques des différents types de mort cellulaire	187

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

α	alpha
AIF	« apoptosis-inducing factor »
Akt/PBB/Rac	« activated by kinase tyrosine / protein kinase B / related to A and C protein kinase »
Apaf-1	« apoptotic protease activating factor-1 »
ATP	adénosine triphosphate
β	bêta
Bax	« Bcl-2-associated X protein »
Bad	« Bcl-2-antagonist of cell death »
Bak	« Bcl-2-antagonist/killer »
Bcl-2	« B-cell lymphoma 2 »
Bcl-xL	« Bcl-2-like 1 »
BH	« Bcl-2 homology domain »
BIR	« baculoviral inhibitory repeat »
BMP	« bone morphogenic protein »
bp	paire de bases
°C	degré Celcius
CA	activé constitutivement
CARD	domaine de recrutement des caspases
caspases	« cysteine aspartic acid-specific proteases »
Cdk	« cyclin dependent kinase »
CH2	« CDC25 homology domain »
cIAP-1	« cellular inhibitor of apoptosis protein 1 »
cIAP-2	« cellular inhibitor of apoptosis protein 2 »
CK2	« casein kinase II »
cm ²	centimètre carré
CO ₂	dioxyde de carbone
COX-2	cyclooxygénase-2
CREB	« c-AMP-response element-binding protein »
DDR1	« discoidin domain receptor 1 »

DHMEQ	« dehydroxymethylepoxyquinomycin »
DN	dominant-négatif
DNA	acides désoxyribonucléiques
cDNA	ADN complémentaire
DNA-PK	« DNA-dependent protein kinase »
dNTP	deoxynucleotide triphosphates
DR4	« death receptor 4 »
DR5	« death receptor 5 »
dT	deoxythymidine
DTT	dithiothreitol
Dvl	« dishevelled »
E3	« ubiquitin protease ligase »
EGF	« epidermal growth factor »
eIF4-BP	« eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein »
ERK	« extracellular signal-regulated kinase »
EMT	« epithelial-mesenchymal transition »
ER α	récepteur à l'oestrogène alpha
FADD	« Fas-associating protein with death domain »
FasL	Fas ligand
FBS	sérum fœtal bovin
FGF	« fibroblast growth factor »
Fig.	figure
FIGO	Fédération internationale de gynécologie
γ	gamma
g	gramme
GPCR	récepteur couplé à une protéine G
GSK-3	« glycogen synthase kinase 3 »
GSPT1	« G ₁ to S phase transition protein »
GSH	« glutathione synthetase »
HCl	acide chlorhydrique
HDM2	« human double minute 2 »

HER	« human epidermal growth factor receptor »
HNPCC	« hereditary non polyposis colorectal cancer »
hrs	heures
IAP	« inhibitor of apoptosis protein »
IBM	« 4-residue IAP-binding motif »
IC ₅₀	concentration inhibitrice 50%
IGF-1	« insulin-like growth factor-1 »
IκB	« inhibitory subunit kappa B »
IKK	« IκB protein kinase »
JNK	« c-jun N-terminal kinase »
KAP	« kinase-associated phosphatase »
kg	kilogramme
L	litre
LAR	« leucocyte common antigen-related »
LMW-PTP	phosphatase à faible poids moléculaire
MAPK	« mitogen-activated protein kinase »
MDR	« multi-drug resistance »
MEK	« MAPK/ERK kinase »
mg	milligramme
MgCl ₂	dichlorure de magnésium
min	minute
MKP-1	« MAPK phosphatase-1 »
MMAC1	« mutated in multiple advanced cancer »
MMLV-RT	« muloney murine leukemia virus reverse transcriptase »
mL	millilitre
MRP1	« multidrug protein 1 »
mTOR	« mammalian target of rapamycin »
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
NaCl	chlorure de sodium
NaHCO ₃	bicarbonate de sodium
NAIP	« neuronal apoptosis inhibitory protein »

nM	nanomolaire
NF- κ B	« nuclear factor kappa B »
nm	nanomètre
NRPTP	« non-receptor like PTP »
NSCLC	« non-small cell lung carcinoma »
OD	densité optique
O-GlcNac	« O-linked N-acetylglucosamine »
OSCC	« oral squamous cell carcinoma »
PAGE	gel de polyacrylamide pour électrophorèse
P-Akt	« phosphorylated Akt »
PARP	« poly(ADP-ribose)polymerase »
PCAF	« p300/CBP-associated factor »
PCR	réaction de la polymérase en chaîne
PDK1	« 3-phosphoinositides-dependent protein kinase-1 »
PDK2	« 3-phosphoinositides-dependent protein kinase-2 »
PDZ	PSD-95/Dig/ZO-1
PEST	proline, acid glutamique, sérine
P-gp	glycoprotéine P
PH	« plecktin homology »
PI	« phosphatidylinositol »
PIP ₂	phosphatidylinositol diphosphates
PIP ₃	phosphatidylinositol triphosphates
PI 3-K	« phosphatidylinositol 3-kinase »
PI-4-P	phosphatidylinositol-4-phosphatase
PI-3,4-P ₂	phosphatidylinositol-3,4-diphosphate
PI-4,5-P ₂	phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PI-3,4,5-P ₃	phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA	protéine kinase A
PKC	protéine kinase C
PP2A	protéine phosphatase 2-A
PP2C	protéine phosphatase 2-C

PP4C	protéine phosphatase 4-C
PP6C	protéine phosphatase 6-C
PPM	« phosphoprotein M »
PPP	« serine/threonine-specific phosphatase protein »
PRL	« phosphatase of regenerating liver »
protéine G	protéine transductrice de signaux par fixation du nucléotide guanine
P70s6K	« 70-kDa ribosomal protein S6 kinase »
PTEN	« phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten »
PTK	« protein tyrosine kinase »
PTP	« protein tyrosine phosphatase »
RAIDD	« RIP-associated ICH-1/CED3-homologous protein with a death domain »
Rb	« retinoblastome protein »
RIP	« receptor-interacting protein »
RNA	acides ribonucléiques
mRNA	ARN messenger
RPTP	« receptor-like PTP »
RT	température pièce
RT-PCR	« reverse transcriptase-polymerase chain reaction »
RTK	récepteur tyrosine kinase
SA- β Gal	« senescence-associated β -galactosidase »
SDS	dodécyl sulfate de sodium
SH2	« C-terminal Src-homology 2 »
SH3	« C-terminal Src-homology 3 »
SHP-2	« Src-homology 2 domain tyrosine phosphatase-2 »
siRNA	« small-interference RNA »
Smac/DIABLO	« second mitochondrial activator of caspases / direct IAP binding protein with low pI »
SSBR	« single strand break repair »

SSH	« slingshots »
TEP1	« TGF- β -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase »
5'TOP	« 5'-terminal oligopyrimidine »
TNF	« tumor necrosis factor »
TNF-1R	« Tumor necrosis factor type 1 receptor »
TNF-2R	« Tumor necrosis factor type 2 receptor »
TNG	« trans-golgi network »
TRADD	« TNF-1R-associated death domain protein »
TRAF-1	« TNF- α receptor associated factor 1 »
TRAF-2	« TNF- α receptor associated factor 2 »
TRAIL	« tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand »
TSC1	« tuberous sclerosis complex 1 »
TSC2	« tuberous sclerosis complex 2 »
μ g	microgramme
μ M	micromolaire
μ L	microlitre
V	Volts
VEGF	« vascular endothelial growth factor »
VH1-like DSP	phosphatase à double spécificité
wt	« wild-type »
XAF-1	« XIAP-associated factor-1 »
XIAP	« X-linked inhibitor of apoptosis proteins »
XRCC1	« X-ray cross-complementing group 1 »

CHAPITRE I
REVUE DE LITTÉRATURE

INTRODUCTION

1.1 Problématique

En Occident, le cancer de l'endomètre est le cancer gynécologique le plus important chez la femme. Approximativement 4100 nouveaux cas seront diagnostiqués au Canada en 2007, faisant ainsi du cancer de l'endomètre le quatrième cancer en importance chez la femme (Société canadienne du cancer 2007). Bien que les femmes atteintes de cette terrible maladie puissent avoir recours à la chirurgie et à la radiothérapie, divers facteurs tels un carcinome endométrial récurrent, une réponse négative aux radiations, l'âge de la femme ainsi que la présence de métastases peuvent empêcher ce type de traitement. Dans de tels cas, c'est la chimiothérapie qui est utilisée et les agents le plus souvent employés sont le cisplatine, la doxorubicine et le paclitaxel (Pectasides et al. 2006). Cependant, le taux de réponse lors de leur utilisation n'est pas supérieur à 35% (Fleming et al. 2004), ce qui démontre un faible taux d'efficacité. Ainsi, la difficulté majeure rencontrée lors de l'utilisation de la chimiothérapie est la résistance cellulaire aux drogues et les mécanismes impliqués dans ce processus doivent à tout prix être élucidés afin d'augmenter le taux de réponse aux drogues et l'espoir de guérison.

1.2 Le développement d'un cancer

1.2.1 Généralités

La prolifération cellulaire est un processus soigneusement contrôlé qui répond à des besoins particuliers de l'organisme. Chez le jeune animal, la multiplication de cellules excède la mort cellulaire, de sorte que la taille de l'individu s'accroît, alors que chez l'adulte, la naissance de nouvelles cellules et la mort d'autres cellules compensent selon un état stationnaire dynamique. Ainsi, il est exceptionnel que l'ajustement délicat exercé sur la prolifération cellulaire se perde : dans ce cas, une cellule grossit et se divise de façon incontrôlée. Lorsque cette autonomie de croissance se transmet aux descendants cellulaires, il y a apparition d'un clone de cellules immortelles qui finit par

former un nodule appelé tumeur. Si celle-ci ne menace pas l'hôte et qu'elle est circonscrite, elle sera qualifiée de tumeur bénigne. Cependant, si elle menace la vie de l'organisme, elle sera plutôt maligne. C'est d'ailleurs cette tumeur maligne qui est à l'origine de la maladie cancéreuse. Les tumeurs malignes se distinguent des tumeurs bénignes par leur caractère envahissant et leur faculté de se disperser dans l'organisme. Elles quittent leur site d'origine et envahissent le tissu voisin, pénétrant ainsi dans le système circulatoire et générant à distance des tumeurs secondaires appelées métastases (Fig.1.1) (Lodish et Darnell 1997).

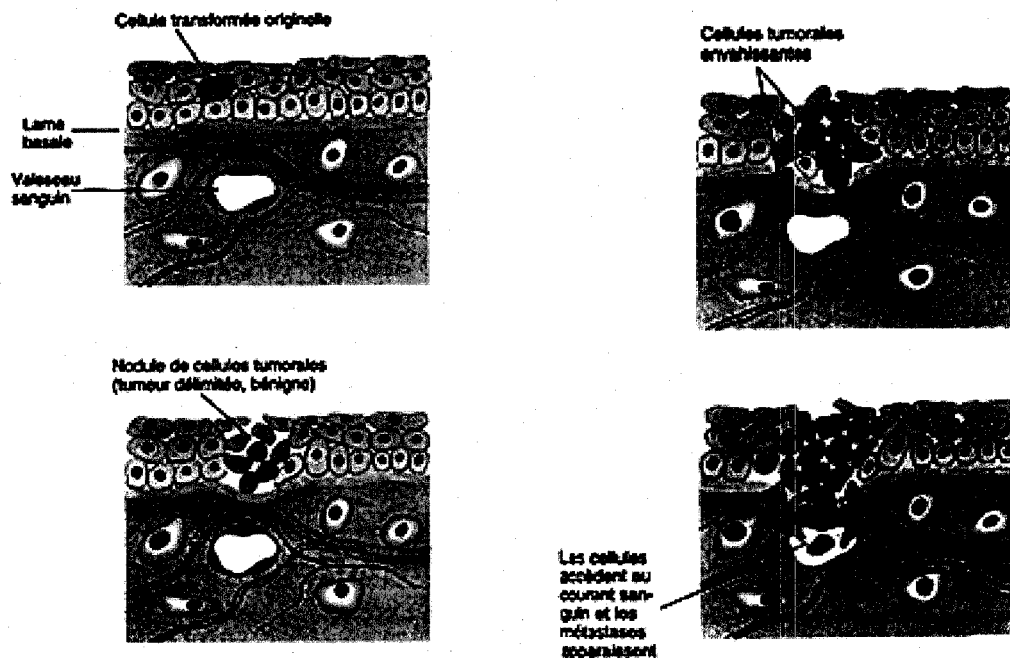


FIGURE 1.1 : Stade de prolifération maligne et d'invasion métastatique tirée de Lodish, H.F. et Darnell, J.E. "Biologie moléculaire de la cellule", traduction de la 3^e édition anglaise, De Boeck Université, Belgique : 1344 pages (1997).

1.2.2 Les événements génétiques causant l'apparition d'une tumeur maligne

Les événements génétiques et physiologiques qui font perdre à la cellule la maîtrise de son cycle cellulaire et amorcent sa prolifération anarchique sont rarement transmis par les gamètes, mais résultent plutôt de modifications touchant l'ADN de certaines cellules somatiques. Il peut s'agir en fait d'une modification touchant les proto-oncogènes (section 1.2.2.1) ou les gènes suppresseur de tumeur (section 1.2.2.2), ce qui

entraînera une prolifération cellulaire incontrôlée. Un remaniement de L'ADN est donc au cœur de l'origine des cancers.

1.2.2.1 Les oncogènes

La perturbation la plus notable menant à l'apparition d'un cancer est la transformation de gènes régissant la prolifération cellulaire, soient les proto-oncogènes, en oncogènes. Le terme oncogène vient du grec *oncos* qui signifie masse. Un oncogène est en fait un gène dont le produit est impliqué dans la transformation de cellules en culture ou dans la tumorigenèse animale (Lodish et Darnell 1997). Parmi les nombreux oncogènes découverts à ce jour, presque tous proviennent de gènes cellulaires normaux. En fait, ce sont des modifications, parfois infimes, qui conduisent à l'augmentation de l'activité des proto-oncogènes, ce qui les convertit en oncogènes. Parmi ces modifications notons l'amplification du gène, l'augmentation de son expression ainsi qu'une translocation ou mutation dans le gène qui rend la protéine constitutivement active (Esteller et al. 1999). Comme la plupart des proto-oncogènes sont essentiels à la survie cellulaire, ils ont été hautement conservés au cours de l'évolution. Au niveau du cancer de l'endomètre, l'oncogène le plus étudié au cours des dernières années est K-Ras et des mutations dans le gène engendrant une activation constitutive de la protéine ce gène ont été identifiées dans 19% à 46% des cas de cancer de l'endomètre (Ryan et al. 2006). La famille des protéines Ras (N, H, K-Ras) est localisée au niveau de la membrane cellulaire et joue un rôle dans l'activation de diverses voies de signalisation telles que celle du PI 3-K/Akt (Phosphatidylinositol 3-Kinase/Activated by kinase tyrosine) (voir sections 1.4-1.5) (McCubrey et al. 2006). Un membre de la famille des HER (human epidermal growth factor receptor), soit le récepteur tyrosine kinase ErbB-2/HER2, est également un oncogène important au niveau du cancer de l'endomètre. En fait, l'expression excessive de ErbB-2/HER2 est présente dans 9% à 30% des cas de cancer de l'endomètre (Ryan et al. 2006). Ce type de récepteur est impliqué dans l'activation de diverses voies de signalisation cellulaire dont PI 3-K/Akt. Enfin, il ne faut pas oublier la présence de Akt parmi ces oncogènes. Étant donné que cette protéine est au cœur de notre étude, une description complète de Akt est présente à la section 1.5.

1.2.2.2 Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes inhibant la prolifération, soient les gènes suppresseurs de tumeurs, sont également impliqués dans l'apparition d'un cancer. Contrairement aux oncogènes, c'est l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs qui conduit à la transformation maligne. Celle-ci peut être causée par une délétion dans le gène, une mutation ponctuelle ou une inhibition de la transcription du gène. Parmi les gènes suppresseurs de tumeurs notons la présence de p53 dont la fonction principale est d'inhiber la prolifération cellulaire afin de permettre la réparation de l'ADN. Si cette réparation est incorrecte, p53 a également la capacité d'induire l'apoptose (section 1.3.3) (Esteller et al. 1999). Les mutations dans le gène p53 sont plus fréquentes dans les grades avancés du cancer de l'endomètre, survenant dans 46% des cas de cancer de grade III (voir section 1.10.4) (Enomoto et al. 1993). De plus, il est important de noter la présence de PTEN (Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome Ten) parmi les gènes suppresseurs de tumeurs. Chez les cancers de l'endomètre, la protéine PTEN est mutée dans 55% à 83% des cas (Fuller et al. 2004) Une description approfondie de cette protéine est d'ailleurs présente à la section 1.6.

1.3 La mort cellulaire par apoptose

1.3.1 Généralités

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un procédé essentiel pour le développement et l'homéostasie. Elle permet l'élimination des cellules superflues durant l'embryogenèse, le remodelage et la réparation cellulaire de même que la destruction des cellules qui ont subi des dommages toxiques. L'apoptose est un mécanisme permettant à la cellule de se suicider et aux organismes multicellulaires de réguler le nombre de cellules dans les tissus en éliminant celles qui ne sont plus requises ou âgées. Avant de discuter en profondeur de la mort cellulaire par apoptose, il est important de décrire les étapes du cycle cellulaire.

1.3.2 Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire se divise en deux grandes parties : l'interphase, pendant laquelle la cellule ne se divise pas, et la phase mitotique (phase M) pendant laquelle la cellule se divise (Fig.1.2). L'interphase est l'étape la plus longue de la division cellulaire et représente généralement 90% de la durée du cycle. Elle se divise en trois périodes de croissance. La première partie s'appelle G_1 (G pour *gap* ou intervalle sans synthèse d'ADN) et correspond à la croissance cellulaire. Par la suite, survient la phase S (S pour synthèse de l'ADN) durant laquelle la cellule continue de croître tout en répliquant ses chromosomes. Pour terminer, il y a la phase G_2 pendant laquelle la cellule poursuit sa croissance et finit de se préparer en vue de la division cellulaire. C'est également pendant cette étape que survient un point de contrôle responsable de l'arrêt du cycle lorsque les cellules subissent des erreurs au cours de la répllication de l'ADN (Tortora et Grabowski 2001).

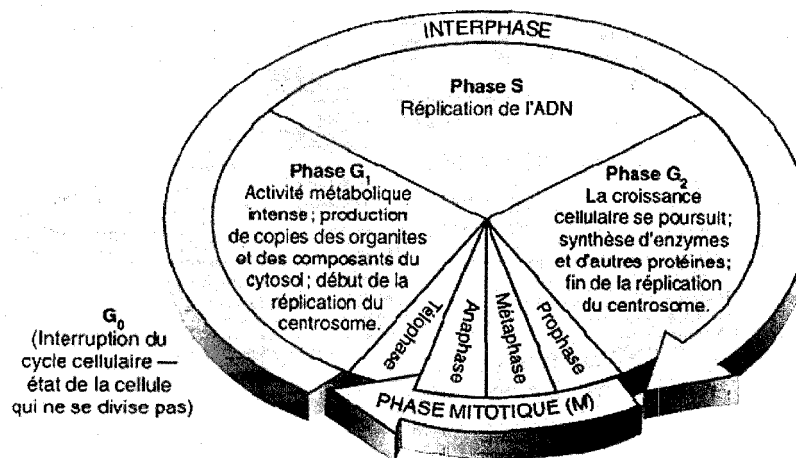


FIGURE 1.2 : Le cycle cellulaire adaptée de Tortora, G.J. et Grabowski, S.R. "Principes d'anatomie et de physiologie", traduction de la 9^e édition anglaise, Édition du renouveau pédagogique, Saint-Laurent : 1121 pages (2001).

La phase mitotique comprend la division nucléaire, ou mitose, et la division du cytoplasme, ou cytokinèse. La phase M est la période la plus courte du cycle cellulaire et se divise en quatre phases : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase (Fig.1.2). Il est à noter que la mitose est un processus continu où les étapes se fondent les unes dans les autres (Tortora et Grabowski 2001).

1.3.3 L'induction de l'apoptose

La mort cellulaire par apoptose survient en deux phases : la première concorde avec la phase d'exécution caractérisée par des changements morphologiques dramatiques, suivie par la mort cellulaire (Takahashi et Earnshaw 1996). L'apoptose est caractérisée par une condensation et une fragmentation de la chromatine nucléaire, une compaction des organelles cytoplasmiques, une dilatation du réticulum endoplasmique, une diminution du volume cellulaire et l'altération de la membrane plasmique (Arends et Wyllie 1991). Les altérations nucléaires, qui sont en fait les changements les plus importants lors de ce type de mort cellulaire, sont associées avec le clivage de l'ADN (Wyllie 1980). Pendant le procédé d'apoptose, des corps apoptotiques sont formés et rapidement ingérés par les macrophages adjacents ou par d'autres cellules phagocytaires avoisinantes (Kamijo et al. 1997; Savill et al. 1990; Savill et al. 1993). Tous ces phénomènes surviennent sans altérer les constituants des cellules environnantes et sans réponse inflammatoire.

La machinerie enzymatique utilisée lors de l'apoptose a été découverte pour la première fois chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hengartner et Horvitz 1994; Hiebert et al. 1989; Kamijo et al. 1997; Yuan 1995). Ce procédé est principalement régulé par trois gènes, *CED3*, *CED4* et *CED9*, dans lequel *CED3* et *CED4* sont des régulateurs positifs, tandis que *CED9* est un facteur anti-apoptotique. Des homologues pour ces gènes ont par la suite été découverts chez les humains, où *CED3* correspond aux caspases, *CED4* à Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor-1) et *CED9* à Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) (Jacobson 1997; Kamijo et al. 1997; Vaux 1997; Zou et al. 1997). L'apoptose peut être initiée par deux voies de signalisation cellulaire : 1) la voie intrinsèque et 2) la voie extrinsèque (Kim 2005). Avant d'expliquer les différences rencontrées entre ces deux voies, il est très important de décrire clairement deux familles de protéines impliquées dans le processus d'apoptose, soient la famille des Bcl-2 et la famille des caspases.

1.3.3.1 La famille des Bcl-2

La cascade apoptotique chez les mammifères est un procédé réalisé en plusieurs étapes (Kennedy et al. 1999). Dans la plupart des cas, cette cascade est initiée par la perte de l'intégrité de la membrane mitochondriale, accompagnée par le relâchement du cytochrome c. Cependant, diverses protéines de la famille des Bcl-2 peuvent empêcher le relâchement du cytochrome c, tandis que d'autres peuvent l'initier.

La famille des Bcl-2 est un regroupement de protéines jouant un rôle crucial lors de l'apoptose et dont les membres font partie de deux groupes distincts : ceux induisant l'apoptose et ceux l'inhibant (Hockenbery 1994; Kroemer 1997; Reed 1994; White 1996; Yang et Korsmeyer 1996). Dans un sens, ils peuvent être considérés comme étant des intermédiaires qui déterminent si la cellule va entrer en apoptose ou survivre. Les membres de la famille des Bcl-2 sont constitués de un ou plusieurs domaines BH (Bcl-2 Homology domain), ce qui permet de les séparer en trois classes : les protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2 contenant trois ou quatre domaines BH (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 et A1), les protéines pro-apoptotiques contenant les domaines BH1, 2 et 3 (Bax, Bak et Bok) et les protéines pro-apoptotiques ayant seulement le domaine BH3 (Bim, Bad, Bid, PUMA et Noxa) (Oberstein et al. 2007). L'homo- et l'hétérodimérisation sont les phénomènes qui permettent aux membres de la famille des Bcl-2 d'exercer leurs fonctions. Plusieurs membres de cette famille, tels que Bcl-2 et Bcl-xL (Bcl-2-like 1), résident dans la membrane externe de la mitochondrie via une séquence d'acides aminés localisés en C-terminal, ce qui permet à la protéine d'être orientée vers le cytoplasme (Green et Reed 1998) et de gouverner le transport d'ions. En fait, le rôle joué par Bcl-2 et Bcl-xL est d'abolir la libération du calcium hors de la mitochondrie (Fig.1.3) (Green et Reed 1998). Cependant, d'autres protéines de la famille des Bcl-2 peuvent contrecarrer l'effet de Bcl-2 et Bcl-xL telle que la protéine Bad (Bcl-2-antagonist of cell death), Bax (Bcl-2-associated X protein) et Bak (Bcl-2-antagonist/killer). À la suite d'un stimulus d'apoptose, les protéines ayant seulement le domaine BH3 sont activées, ce qui leur permet de réprimer les protéines anti-apoptotiques et d'activer les protéines pro-apoptotiques via des interactions protéine-

protéine directes (Willis et Adams 2005). Cette activation des protéines Bax et Bak permet donc leur oligomérisation à la membrane mitochondriale, le relâchement du cytochrome c et, subséquemment, l'activation des caspases (Fig.1.3).

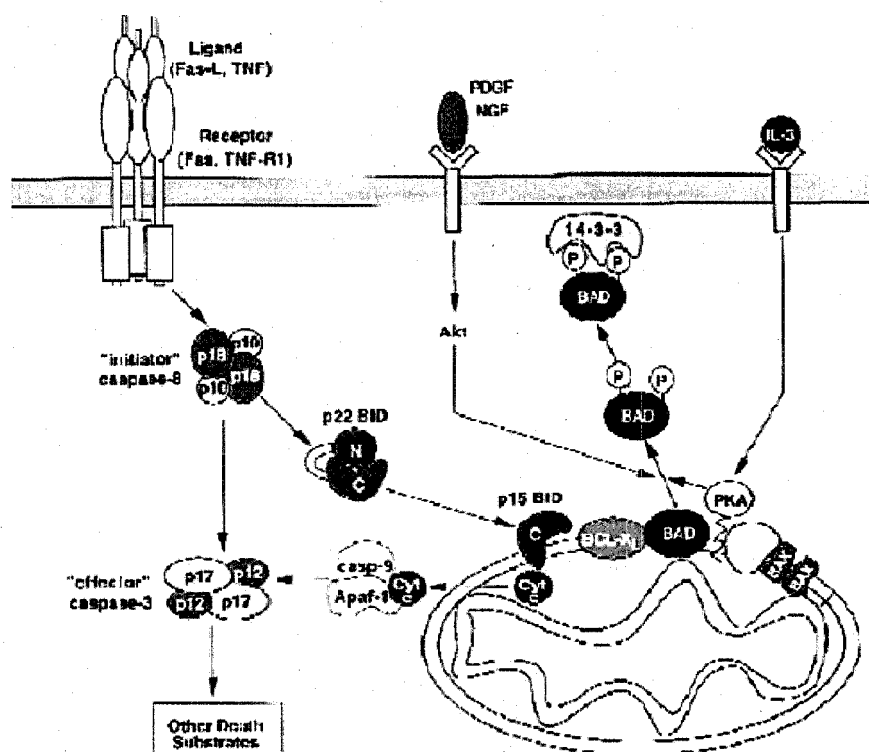


FIGURE 1.3 : Voie de signalisation menant à l'apoptose adaptée de Gross, A. et al. " BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis" *Genes and Dev.* 13 : 1899-1911 (1999).

1.3.3.2 La famille des caspases

La famille des caspases (cysteine aspartic acid-specific proteases) compte à l'heure actuelle 14 membres, allant de la caspase-1 à la caspase-14, dont la seule caractéristique commune de ces membres est la présence d'un acide aspartique en position P_1 (Cohen 1997a). Les caspases sont exprimées dans une variété de tissus et leur localisation cellulaire varie. Par exemple, la caspase-1 et la caspase-3 sont prédominantes dans le cytosol (Nakagawa et al. 2000), tandis que la caspase-9 se retrouve en grande partie au niveau mitochondrial (Li et al. 1997b). Les caspases existent dans les cellules sous la forme d'une pro-enzyme qui peut être clivée à un résidu aspartate, générant ainsi une petite et un grosse sous-unité qui, à la suite du clivage,

formeront un tétramère $\alpha_2\beta_2$ afin de constituer la caspase active (Villa et al. 1997). Cette activation peut être produite par le recrutement de la caspase à un complexe d'activation ou par d'autres caspases (Cryns et Yuan 1998). Les caspases possèdent toutes une sous-unité catalytique contenant un site actif hautement conservé, soit le domaine QACXG, où X représente les acides aminés R, Q ou G. De plus, elles possèdent un pro-domaine en N-terminal et, selon la longueur de ce pro-domaine, les caspases peuvent être divisées en deux classes : les caspases initiateuses qui renferment un long pro-domaine (caspase-2, -8, -9, -10) et les caspases effectrices qui possèdent plutôt un petit pro-domaine (caspase-3, -6, -7) (Salvesen et Dixit 1997; Thornberry et Lazebnik 1998). Cette distinction est très importante puisqu'elle permet de déterminer la fonction cellulaire de chaque classe. Un autre sous-groupe de caspases a également été découvert et est impliqué dans le traitement des cytokines (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13, -14). Étant donné que nous désirons analyser l'impact des drogues sur l'induction de l'apoptose sans le traitement des cytokines, les sections qui suivent porteront seulement sur les caspases initiateuses et effectrices.

Les caspases initiateuses, comme leur nom l'indique, initient le processus d'apoptose. En fait, lors de la régulation de ce type de mort cellulaire, l'importance du pro-domaine chez les caspases initiateuses est caractérisée par la présence, dans ce pro-domaine, de régions adaptatrices : la région homologue à FADD (Fas-associating protein with death domain) ou la région CARD (caspase recruitment domain) (Fig.1.4) (Cohen 1997a). Ces régions rendent possible la liaison des caspases initiateuses avec des récepteurs de mort cellulaires de la famille des TNF (tumor necrosis factor) dont Fas (CD95/APO-1), TNF-1R et TNF-2R (tumor necrosis factor type 1 or 2 receptor) ou des molécules impliquées dans l'apoptose comme Apaf-1, ce qui leur permettra d'activer les caspases effectrices. Une description plus approfondie des mécanismes d'activation de la caspase-9 est présentée à la section 1.3.3.3, tandis que celle pour la caspase-2, -8 et -10 est présente dans la section 1.3.3.4.

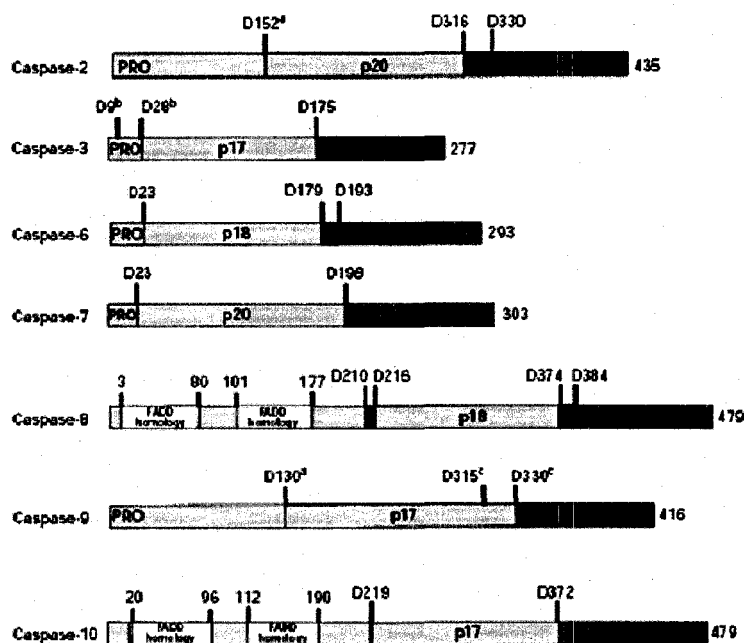


FIGURE 1.4 : Structure des gènes des caspases initiatrices et effectrices adaptée de Cohen, G.M. "Caspases : the executioners of apoptosis" Biochem. J. 326 : 1-16 (1997).

Une fois activées par les caspases initiatrices, les caspases effectrices interagissent plutôt avec un nombre important de protéines cellulaires. Par exemple, les caspase-3 et -7 sont reconnues pour cliver et inhiber des membres de la famille des PARP (poly(ADP-ribose)polymerase). La famille des PARP est constituée de 18 protéines codées par différents gènes et possède un domaine catalytique hautement conservé. PARP-1 (113kDa) est le membre principal de cette grande famille (Ame et al. 2004; Huber et al. 2004), c'est d'ailleurs pour cette raison qu'il fait partie de notre étude. Ainsi, lorsqu'il sera mentionné de PARP dans cette thèse, il s'agit en fait de PARP-1. Le rôle de PARP au niveau cellulaire est d'être impliqué dans la réparation de l'ADN. En fait, cette protéine a la capacité de détecter les dommages causés à l'ADN et permet le relâchement de la chromatine. Les enzymes de réparation de l'ADN telle que XRCC1 (X-ray cross-complementing group 1) et SSBR (single strand break repair) sont par la suite recrutées, ce qui permet la réparation de l'ADN (Ame et al. 2004; Huber et al. 2004). Ainsi, lorsque la caspase-3 ou la caspase-7 clivent PARP, cette protéine est inhibée, diminuant ainsi la réparation de l'ADN. La cellule entre donc en apoptose. Pour ce qui est de la caspase-6, celle-ci a comme cible principale la lamine A, une protéine majeure présente dans la structure de l'enveloppe nucléaire (Cohen 1997a). Le clivage de la lamine A

conduit à divers changements nucléaires tels que la rupture de la membrane nucléaire. L'inhibition de PARP et de la lamine A par les caspases effectrices conduit donc à l'inhibition du contact cellule-cellule, à la libération des nucléases de l'ADN afin de permettre la fragmentation de l'ADN et à l'apoptose (Wolf et Green 1999). Cependant, il ne faut pas oublier que les caspases effectrices possèdent également la capacité d'activer d'autres caspases. En fait, il a été reconnu que la caspase-3 peut activer la caspase-2 et la caspase-6 et que cette caspase-6 peut également cliver et activer les caspases effectrices 8 et 10 (Creagh et Martin 2001)

1.3.3.3 La voie intrinsèque de l'apoptose

La voie d'apoptose intrinsèque est activée par le manque d'oxygène (hypoxie), les dommages à l'ADN et l'inhibition de l'activité de divers oncogènes dont Akt. En résumé, lorsque la cellule reçoit un signal d'apoptose, la protéine Bad est relâchée de son complexe qu'elle formait préalablement avec la protéine 14-3-3 (Fig.1.3, page 9). Cette libération permet donc à Bad d'aller inhiber la protéine Bcl-xL, ce qui augmente la perméabilité de la membrane mitochondriale et le relâchement du cytochrome c et AIF (apoptosis-inducing factor) dans le cytosol. AIF se dirige ensuite directement au noyau, où il produit la condensation de la chromatine et la fragmentation du noyau. Il est à noter que c'est le cytochrome c qui met en place les derniers événements de l'apoptose, car il est le seul activateur connu de la protéine cytoplasmique Apaf-1. Sous l'effet de l'activation du cytochrome c, le monomère Apaf-1 est donc transformé en un complexe oligomérique constitué d'au moins huit sous-unités (Hu et al. 1998; Saleh et al. 1999; Zou et al. 1999). Ce complexe, en présence d'ATP, peut alors se lier, via son domaine CARD, et cliver la procaspase-9, induisant ainsi le relâchement de la caspase-9 mature (Hu et al. 1999). L'importance de l'activation de la caspase-9 par Apaf-1 a été démontrée par le fait qu'une déficience en Apaf-1 ou en caspase-9 résulte en une létalité au stade embryonnaire due en un défaut d'apoptose neuronale (Cecconi et al. 1998; Hakem et al. 1998; Kuida et al. 1998; Yoshida et al. 1998). Lorsque la caspase-9 est activée, celle-ci peut à son tour cliver et activer la caspase-3, ce qui engendre une

cascade d'événements qui ont été décrit à la section 1.3.3.2, soient l'activation d'autres caspases et l'inhibition de protéines telles que PARP ou la lamine A.

1.3.3.4 La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie apoptotique extrinsèque est induite par des récepteurs de mort cellulaire membres de la famille des récepteurs TNF dont Fas et TNF-R1. Pour qu'ils soient activés, ces récepteurs requièrent la liaison de leur ligand tels que le ligand Fas (FasL) ou le TNF qui exercent leur activité biologique en causant la multimérisation des récepteurs à la surface cellulaire. Cela permet donc l'activation des récepteurs qui peuvent maintenant jouer leurs rôles au niveau de la différenciation et la prolifération cellulaire ou dans le déclenchement de l'apoptose (Gruss et Dower 1995). De plus, la voie extrinsèque de l'apoptose peut être induite par le ligand TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand). Ce dernier a la capacité de se lier à divers récepteurs de mort cellulaire tels que DR4 et DR5 (death receptor 4 et 5), ce qui déclenche le processus d'apoptose. Une fois activés, les récepteurs CD95, TNF-R1, DR4 ou DR5 recrutent la protéine adaptatrice FADD, ce qui permet la liaison de la caspase-8 et -10 au récepteur (Cohen 1997a). Il en résulte donc l'activation de ces caspases via leur clivage, ce qui permet à la caspase-8 d'activer à son tour les caspases effectrices 3 et 7 (Bergman 2003; Boatright et Salvesen 2003; Kamijo et al. 1997) et à la caspase-10 d'activer la caspase-3 et la caspase-6 (Park et al. 2004). Pour ce qui est de la caspase-2, celle-ci possède un pro-domaine d'environ 100 acides aminés contenant le domaine CARD qui peut se lier à la protéine RAIDD (receptor-interacting protein-associated ICH-1/CED-3-homologous protein with a death domain) présente sur le domaine cytoplasmique des récepteurs de mort cellulaire CD95 et TNF-1R. Il est à noter que cette interaction caspase-2-RAIDD survient grâce aux protéines associées au TNF-1R, les protéines RIP (receptor-interacting protein) et TRADD (TNF-1R-associated death domain protein) (Villa et al. 1997). Suite à son activation, la caspase-2 peut à son tour cliver et activer la caspase-3.

Il est important de noter qu'une dérégulation de l'apoptose a été impliquée dans la pathogenèse de diverses maladies, incluant les désordres neurodégénératifs et le cancer (Thompson 1995). En effet, il a été établi qu'une augmentation de l'expression de Bcl-2 est impliquée dans le développement de certains types de cancer dont celui de la prostate, du colon et du poumon (Reed 1996). De plus, il a clairement été prouvé que des défauts dans les voies de signalisation menant à l'apoptose confèrent la résistance aux agents chimiothérapeutiques. En effet, il a été démontré que les cellules souches provenant d'embryons ayant un phénotype caspase-9 $-/-$ sont résistantes à l'apoptose induite par la doxorubicine (section 1.10.5.3) (Kaufmann et Earnshaw 2000) et que les lymphocytes dérivés du thymus, les thymocytes, qui possèdent le phénotype Apaf-1 $-/-$ démontrent une résistance envers les radiations γ (Kaufmann et Earnshaw 2000).

1.4 La voie de survie du phosphatidylinositol 3-Kinase (PI 3-K)

1.4.1 Généralités

PI 3-K constitue une famille de kinases lipidiques caractérisées par leur capacité à phosphoryler un groupe de phospholipides inositols afin de générer des seconds messagers impliqués dans la prolifération cellulaire. Étant donné qu'il a été reconnu que l'expression excessive de PI 3-K est impliquée dans le développement de divers cancers dont celui de l'ovaire (Shayesteh et al. 1999) et du col utérin (Lee et al. 2006a), nous avons donc orienté nos recherches au niveau du rôle possible de la voie de signalisation engendrée par PI 3-K lors d'un cancer de l'endomètre.

1.4.2 Les classes de PI 3-K

Chez les mammifères, les membres de la famille des PI 3-K peuvent être groupés en trois classes majeures, basées sur leur séquence primaire, les mécanismes de régulation et la spécificité envers les substrats. La classe I de PI 3-K est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85) (Escobedo et al. 1991; Hiles et al. 1992; Morgan et al. 1990; Otsu et al. 1991; Skolnik et

al. 1991). Chez les mammifères, trois gènes différents codent pour la sous-unité catalytique, p110 α , p110 β et p110 γ et deux gènes codent pour les isoformes de la sous-unité régulatrice, p85 α (*Pik3r1*) et p85 β (*Pik3r2*). Le *Pik3r1* produit également deux transcrits codant pour de petites protéines p55 α et p50 α et un troisième gène code pour p55 γ (*p55PIK*), une protéine ayant une structure similaire à p55 α . Il a été reconnu que chacun des isoformes démontre une distribution différente, tout dépendant du tissu (Inukai et al. 1997). En fait, p55 α est fortement exprimé dans le cerveau et les muscles lisses comparativement à p85, indiquant que p55 α joue un rôle important au niveau de ces tissus (Inukai et al. 1996).

L'analyse de séquence de la sous-unité p110 a révélé la présence des diverses régions, incluant le site de liaison avec la sous-unité régulatrice p85, un domaine de liaison avec la protéine Ras et le domaine catalytique (Dhand et al. 1994; Leever et al. 1996; Zvelebil et al. 1996). La sous-unité p85 possède un domaine SH3 (C-terminal Src-homology 3) en N-terminal et deux domaines SH2 (C-terminal Src-homology 2) séparés par un domaine inter-SH2 (Holt et al. 1994; Klippel et al. 1994). Les domaines SH2 et SH3 sont reconnus pour permettre les interactions protéine-protéine, point critique lors de l'induction de voie de signalisation cellulaire (MacDougall et al. 1995).

La sous-unité p85 peut être activée par des récepteurs ayant une activité tyrosine kinase (RTK) ou couplés à la protéine G (GPCR) (Katso et al. 2001; Vanhaesebroeck et Waterfield 1999), des intégrines induisant l'adhésion cellulaire (Banfic et al. 1998; Xia et al. 2004), par l'action d'oncogènes comme Ras (Rodriguez-Viciano et al. 1994; Rodriguez-Viciano et al. 1996) et par diverses hormones telle que l'oestrogène (Hisamoto et al. 2001; Sun et al. 2001b; Yu et al. 2004). Une stimulation du récepteur résulte donc en l'autophosphorylation de résidus tyrosines spécifiques au niveau du domaine SH2 de p85, induisant ainsi le recrutement et la liaison de cette sous-unité avec le récepteur via ses motifs phosphotyrosines (Kapeller et Cantley 1994). Par la suite, la sous-unité p110 va se lier à p85 pour être activée (Hu et al. 1993). Cependant, la sous-unité p110 γ peut également être associée et activée par la protéine Ras, sans la participation de p85 (Fig.1.5) (Kodaki et al. 1994; Rodriguez-Viciano et al. 1997;

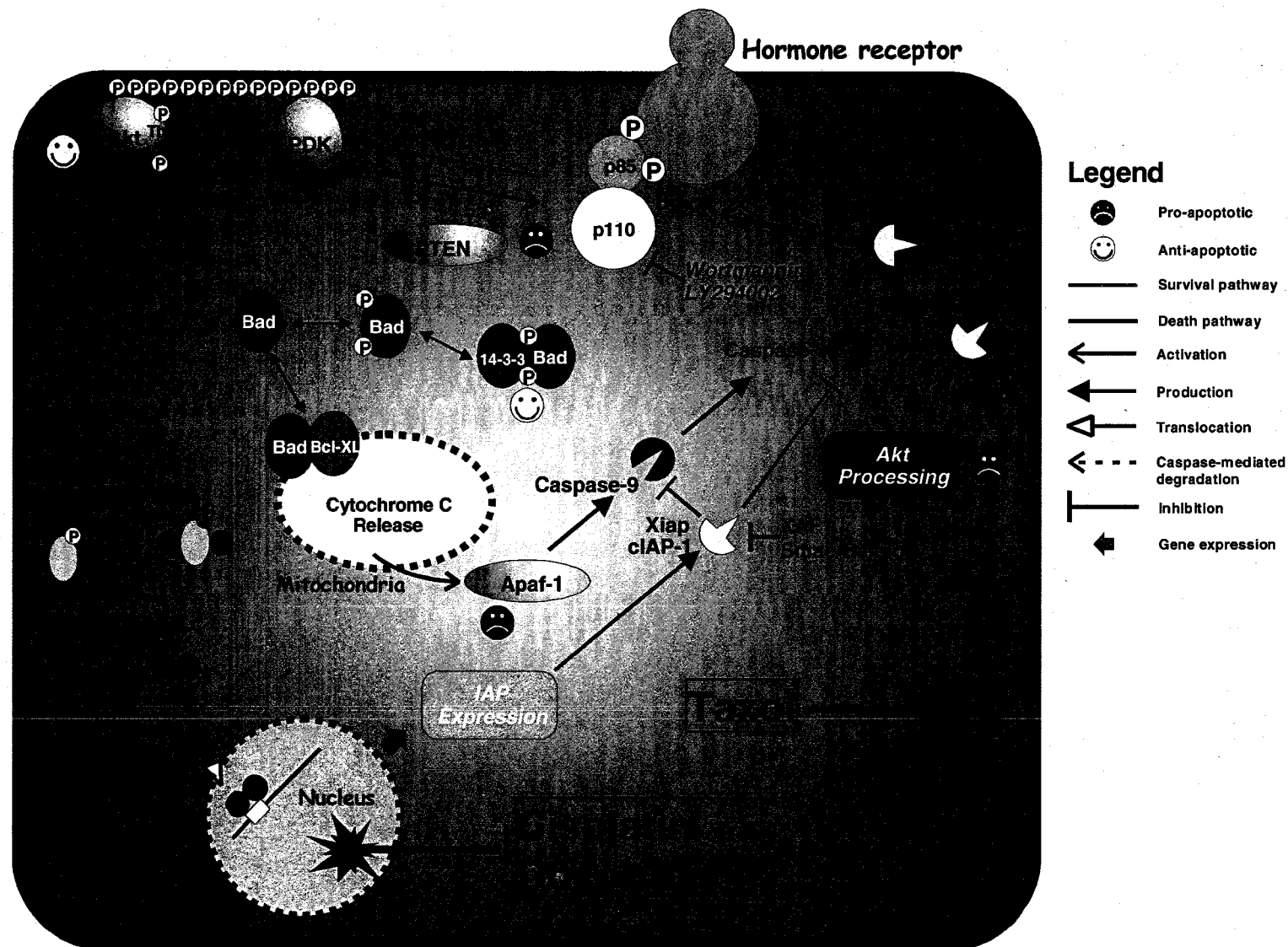


FIGURE 1.5 : Voie de signalisation simplifiée de PI 3-K/Akt.

Stoyanov et al. 1995). Suite à l'activation de ses sous-unités, PI 3-K catalyse, en position D3, la phosphorylation des phosphatidylinositols (PIs) tels que le phosphatidylinositol-4-phosphate (PI-4-P) et le phosphatidylinositol-4,5-diphosphates (PI-4,5-P₂), induisant ainsi une production locale de phosphatidylinositol-3,4-diphosphates (PI-3,4-P₂ ou PIP₂) et de phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphates (PI-3,4,5-P₃ ou PIP₃) respectivement (Fig.1.5) (Vivanco et Sawyers 2002). Ces lipides agissent ensuite comme des seconds messagers en se liant au domaine PH (pleckstrin homology), qui permet les interactions protéine-protéine et lipide-protéine (Robertson 2005) et présent au niveau de protéines telles que Akt et PDK1 (3-phosphoinositides-dependent kinase-1) de façon à les recruter vers la membrane plasmique où ils seront activés.

La classe II de PI 3-K est en fait la protéine P210 chez l'humain et possède un domaine C2 (Zvelebil et al. 1996). Elle utilise préférentiellement le PI et le PI-4-P comme substrat (Domin et al. 1997). Elle a été isolée *in vitro* en utilisant la technique de polymérisation en chaîne (PCR) chez la drosophile et l'humain et peut phosphoryler le PI-4,5-P₂ en présence de phosphatidylserine. La classe III de l'humain est un phosphatidylinositol 3-kinase spécifique (PI-specific 3-K) (Panaretou et al. 1997). Cette classe a été définie grâce à diverses études réalisées chez les levures. Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisia*, la classe III comporte le gène *Vps34* codant pour une protéine requise pour le triage des protéines dans les vacuoles : un compartiment similaire aux lysosomes chez les eucaryotes. De plus, il a été démontré que *Vps34* possède une spécificité restreinte au PI (Schu et al. 1993). Dans le cadre de notre étude, nous nous sommes intéressés seulement à la classe I de PI 3-K puisque c'est seulement ce type de PI 3-K qui active la voie de signalisation de Akt (Vanhaesebroeck et Alessi 2000). Ainsi, lorsqu'il sera mentionné de PI 3-K dans le texte, nous ferons référence à la classe I.

1.4.3 L'inhibition de PI 3-K

Deux composés sont utilisés comme inhibiteurs de PI 3-K : la Wortmannin et le LY294002. À faibles concentrations, la Wortmannin inhibe de façon irréversible la

classe I de PI 3-K en se liant à la sous-unité catalytique p110 (Powis et al. 1994). Lors d'expérimentations effectuées sur une large variété de protéines kinases, la Wortmannin s'est révélée avoir un haut niveau de sélectivité pour le PI 3-K (Davies et al. 2000). De plus, elle a été reconnue pour inhiber la phosphorylation de Akt de 50% ou plus (Lemke et al. 1999; Ng et al. 2000). Le LY294002 est un dérivé de flavonoïde reconnu pour être un inhibiteur réversible et compétitif de PI 3-K en se liant au site de liaison de l'ATP. À des concentrations quelque peu supérieures à celles de la Wortmannin, le LY294002 est approximativement 500 fois plus efficace que cette dernière (Sanchez-Margalet et al. 1994). De plus, chez les cellules du cancer du poumon, le LY294002 inhibe la phosphorylation de Akt et induit l'apoptose (Brognard et al. 2001).

1.5 Akt/PKB/Rac et ses isoformes

1.5.1 Généralités

Le gène Akt/PKB/Rac (Activated by kinase tyrosine/Protein B Kinase/Related to A and C protein kinase) retrouvé chez l'humain est un homologue de la forme virale v-akt, un oncogène traduit à partir du gène AKT8 causant des lymphomes chez la souris (Staal et al. 1977; Staal et Hartley 1988). En 1990, l'analyse de la séquence virale de Akt (v-akt), de même que de ses homologues cellulaires, a révélé qu'il code pour une protéine sérine/thréonine kinase, composée d'un domaine catalytique central très similaire à celui retrouvé chez la protéine kinase C (PKC) et la protéine kinase A (PKA), d'une queue C-terminale démontrant des similitudes avec la région régulatrice présente chez les membres de la famille PKC et d'un domaine PH situé en NH₂-terminal (Fig.1.6) (Bellacosa et al. 1991; Robertson 2005). C'est d'ailleurs ce domaine PH qui confère à Akt sa différence avec les protéines PKC et PKA (Datta et al. 1996; Eves et al. 1998).

1.5.2 Les différents isoformes de Akt

À ce jour, trois membres de la famille Akt ont été identifiés : Akt1/PKB α , Akt2/PKB β et Akt3/PKB γ (Jones et al. 1991; Konishi et al. 1995) (Fig.1.6). Akt1 et

Akt2 ont été les premiers isoformes à être isolés (Cheng et al. 1992; Jones et al. 1991), tandis que Akt3 a subséquemment été cloné via un criblage d'homologie (Nakatani et al. 1999a). Bien que Akt1 soit l'authentique homologue humain de v-akt (98% d'identité au niveau des acides aminés), Akt2 et Akt3 sont étroitement reliés à cette kinase (Cheng et al. 1992; Nakatani et al. 1999a). Il est à noter que les trois isoformes de Akt sont hautement homologues à v-akt et que l'homologie globale entre ces trois isoformes est supérieure à 85%. Les trois isoformes possèdent des résidus conservés sérine et thréonine qui, avec le domaine PH, sont critiques pour l'activation de Akt. La région C-terminale de ces trois isoformes est la plus divergente (homologie entre 73% et 84%), comparée avec le domaine kinase (90-95% d'homologie), suggérant que cette région peut représenter la différence fonctionnelle entre Akt1, Akt2 et Akt3. La localisation chromosomique pour chaque gène de Akt humain a été identifiée par l'hybridation en fluorescente *in situ*: 14q32 pour Akt1, 19q13.1-13.2 pour Akt2 et 1q44 pour Akt3 (Nakatani et al. 1999b; Staal et al. 1988).

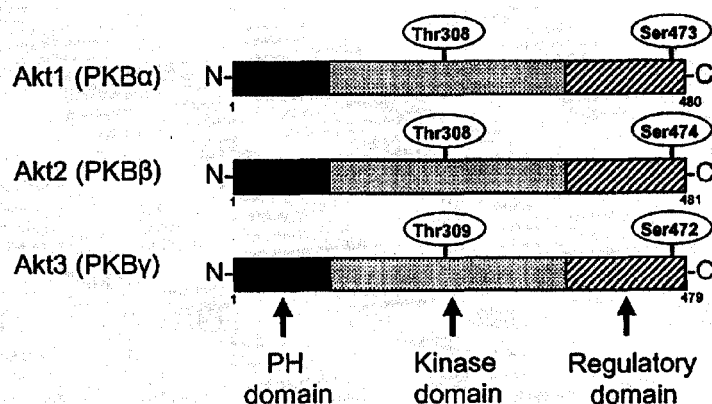


FIGURE 1.6: Domaines fonctionnels des trois isoformes de la protéine Akt chez l'humain tirée de Osaki, M. et al. "PI3K-Akt pathway : Its functions and alterations in human cancer", *Apoptosis* 9: 667-676 (2004).

Bien que Akt1, Akt2 et Akt3 démontrent un haut niveau d'homologie en terme de séquence, il existe des différences claires entre les trois isoformes en ce qui a trait à leurs fonctions biologiques et physiologiques. Par exemple, Sun et al. (2001) ont constaté lors d'une étude clinique, qu'approximativement 40% des cancers de l'ovaire et du sein et plus de 50% des cancers de la prostate démontrent une augmentation de l'activité kinase

de Akt1; et que près de 80% des tumeurs ayant une activité élevée de Akt1 sont des cancers de stade III/IV (voir section 1.10.4) (Sun et al. 2001c). De plus, l'expression excessive de Akt2, mais non celle de Akt1 et de Akt3, transforme les cellules NIH 3T3 et induit l'invasion et les métastases chez les cellules cancéreuses du sein et de l'ovaire (Arboleda et al. 2003; Cheng et al. 1997). L'amplification de Akt2 est spécialement fréquente lors de tumeurs non différenciées, suggérant ainsi que des altérations dans le gène Akt2 peuvent être associées avec l'agressivité des tumeurs (Coffer et al. 1998). De plus, Akt2 seulement joue un rôle unique dans la différenciation des muscles (Kaneko et al. 2002; Vandromme et al. 2001). Enfin, il a été démontré que l'expression de Akt1 et de Akt2 est relativement uniforme dans les organes normaux, tandis que de hauts niveaux d'ARNm de Akt3 ont été détectés dans les muscles squelettiques, le cœur, le placenta et le cerveau (Altomare et al. 1995; Bellacosa et al. 1993).

1.5.3 Différences rencontrées chez les souris déficientes en Akt1, Akt2 ou Akt3

À l'heure actuelle, il a clairement été établi que les souris déficientes en Akt1, Akt2 ou Akt3 démontrent des phénotypes différents. En effet, une étude démontre que chez les souris déficientes en Akt2, l'insuline n'est pas présente au niveau du foie et des muscles squelettiques, ce qui se traduit par une incapacité de diminuer le taux de glucose sanguin (Cho et al. 2001). Ces résultats démontrent donc que la protéine Akt2 est essentielle dans le maintien de l'homéostasie du glucose. D'autres résultats démontrent que, comparativement à Akt2, une déficience en Akt1 n'engendre pas de phénotype de diabète chez la souris (Chen et al. 2001). Ces mêmes résultats révèlent plutôt que les souris Akt1 $-/-$ sont de plus petite taille et que, lorsqu'elles sont exposées aux radiations γ , leur durée de vie est considérablement diminuée comparativement aux souris exprimant la protéine à l'état sauvage (Chen et al. 2001). Il a également été révélé que, tout comme Akt1, la protéine Akt3 n'est pas impliquée dans le métabolisme du glucose. Cependant, lorsque des analyses avec les souris déficientes en Akt3 ont été réalisées par l'équipe de Easton et al. (2005), il a été établi que la protéine Akt3 est plutôt impliquée dans le développement cérébral (Easton et al. 2005). En fait, ils ont démontré que, comparativement à celles ayant le phénotype Akt1 $-/-$ qui démontrent une diminution de

la grosseur de tous les organes, les souris Akt3 -/- présentent une diminution au niveau de la grosseur du cerveau seulement et selon une proportion de 20%. De plus, ils révèlent que la diminution s'explique par une décroissance du nombre de cellules cérébrales, mais également par le fait que ces cellules sont de plus petite taille que celles présentes chez les souris Akt3 +/+ (Easton et al. 2005)

1.5.4 Les mécanismes d'activation de Akt

Diverses études ont démontré que la protéine Akt est activée par une variété de stimuli tels que les facteurs de croissance, les inhibiteurs de phosphatases dont l'acide okadaïque et le stress (Burgering et Coffey 1995; Franke et al. 1995; Konishi et al. 1996). Ainsi, l'activation de Akt produite par les facteurs de croissance est induite par la voie de signalisation de PI 3-K (Datta et al. 1996) et dépend 1) de l'intégrité du domaine PH et 2) de la phosphorylation de ses sites actifs. Pour les trois isoformes de Akt, l'activation est similaire par le fait que la phosphorylation survient au niveau de deux sites bien précis : la thréonine 308 (Thr 308 chez Akt2 et Thr 309 chez Akt3) présente dans le domaine catalytique et la sérine 473 (Ser 474 pour Akt2 et Ser 472 pour Akt3) qui se situe dans le motif hydrophobe C-terminal (Osaki et al. 2004). En fait, à la suite d'une stimulation des récepteurs tyrosine kinase, PI 3-K est activée, ce qui permet la production de PIP₃, la translocation de la protéine Akt à la membrane plasmique et sa liaison avec les phospholipides membranaires. L'interaction du domaine PH de Akt avec les phospholipides est suffisante pour provoquer un changement de conformation chez Akt, résultant ainsi en l'exposition de ses deux sites de phosphorylation (Alessi et al. 1996). De plus, le domaine PH peut également induire le rapprochement de Akt et PDK1, permettant ainsi à PDK1 de phosphoryler Akt à sa thréonine 308, résultant ainsi en la stabilisation de la forme active de Akt. À ce jour, les mécanismes impliqués dans la phosphorylation de la sérine 473 ne sont pas complètement identifiés. Cependant, plusieurs candidats ont été suggérés, incluant «MAPK-activated protein kinase 2» (Alessi et al. 1996; Rane et al. 2001), «integrin-linked kinase» (Delcommenne et al. 1998), «DNA-dependent protein kinase» (Feng et al. 2004) et «mTOR-mammalian target of rapamycin complex» (Sarbassov et al. 2005). L'activation complète de la protéine

requière donc la phosphorylation de ses deux sites (Scheid et al. 2002), mais également celle de sites additionnels, incluant l'autophosphorylation de la thréonine 72 et de la sérine 246 (Li et al. 2006c).

1.5.5 Les fonctions cellulaires de Akt

À la suite de son activation, Akt est détachée de la membrane cellulaire, ce qui lui permet d'activer à son tour ses divers substrats cytoplasmiques et nucléaires (Andjelkovic et al. 1997). L'activation de Akt est déjà établie comme étant un facteur de survie important chez une cellule. Cependant, Akt peut également exercer une activité anti-apoptotique en induisant la phosphorylation de Bad. Cela permet donc à la protéine 14-3-3 de se lier et de séquestrer Bad au niveau du cytoplasme, inhibant ainsi le relâchement du cytochrome c hors de la mitochondrie (Fig 1.3-1.5) (Whang et al. 2004). Akt peut également empêcher l'activation de la mort cellulaire par apoptose grâce à sa capacité d'inactiver la procaspase-9 (Downward 2004) et le facteur de transcription FOXO. Ce dernier, à l'état fonctionnel, induit l'expression de gènes critiques pour l'apoptose, tel que Fas ligand. Akt active également la kinase IKK (inhibitory subunit kappa B protein kinase), un régulateur positif de NF- κ B (nuclear factor kappa B), ce qui résulte en la transcription de gènes anti-apoptotiques, dont certains IAPs (inhibitor of apoptosis protein) (section 1.7) (Fig.1.5, page 16) (Pommier et al. 2004). De plus, afin de contrecarrer l'apoptose, Akt favorise la phosphorylation et la translocation de Mdm2 vers le noyau, où il régule négativement p53 empêchant ainsi l'arrêt du cycle cellulaire (Mayo et Donner 2002; Zhou et Hung 2002).

Afin d'induire la progression du cycle cellulaire, Akt a la capacité d'empêcher la dégradation de la cycline D1 en inactivant la protéine GSK 3 β (glycogen synthase kinase 3 beta) (Liang et Slingerland 2003). Akt est également une protéine antagoniste directe des inhibiteurs du cycle cellulaire p21^{WAF1} et p27^{Kip1}, car elle phosphoryle un site positionné près du signal de localisation nucléaire, induisant ainsi leur rétention dans le cytoplasme (Testa et Bellacosa 2001). Akt augmente également la synthèse de protéines en augmentant la phosphorylation de mTOR (mammalian target of rapamycin). De plus,

elle peut activer la voie de mTOR en inhibant le complexe formé par deux gènes suppresseurs de tumeurs TSC1 et TSC2 (tuberous sclerosis complex 1 and 2), également nommé hamartin et tuberlin (Astrinidis et Henske 2005). La protéine mTOR est reconnue pour induire la croissance et la prolifération cellulaire en régulant la biogénèse ribosomale et la traduction des protéines (Ruggero et Sonenberg 2005). Elle peut également réguler la réponse aux nutriments en restreignant la progression du cycle cellulaire en présence de conditions de croissance non optimales (Plas et Thompson 2005). Brièvement, mTOR stimule la synthèse de protéines via la phosphorylation de P70s6K (70-kDa-ribosomal protein S6 kinase) et des protéines de liaison eIF4E 1, 2, 3 (4E-BPs «eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein»). À son tour, P70s6K phosphoryle la protéine ribosomale S6 afin d'augmenter la traduction de l'ARNm avec la région 5'TOP (5'-terminal oligopyrimidine). La phosphorylation de 4E-BPs induit le relâchement du facteur d'initiation eIF4E résultant en la traduction de messagers tels que ceux codant pour la cycline D1 et le VEGF (vascular endothelial growth factor) (Bjornsti et Houghton 2004; Ruggero et Pandolfi 2003).

De plus, la migration des cellules tumorales est en partie liée à la voie de signalisation de Akt (Lefranc et al. 2005). En fait, la protéine Akt a été reconnue pour contribuer à l'invasion des tumeurs et des métastases en promouvant la sécrétion des métalloprotéinases de la matrice (Thant et al. 2000) et l'induction du EMT (epithelial-mesenchymal transition). Akt phosphoryle également les transcriptases inverses, qui stimulent l'activité des télomérases et la réplication (Liu 1999). Collectivement, ces résultats indiquent que la régulation à la hausse de la voie de signalisation de Akt peut être impliquée dans plusieurs aspects de la formation des tumeurs.

1.6 Le gène suppresseur de tumeurs PTEN

1.6.1 La structure du gène PTEN

PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) est également nommé MMAC1 (mutated in multiple advanced cancers) et TEP1 (TGF- β -

regulated and epithelial cell-enriched phosphatase) (Li et Sun 1997; Steck et al. 1997). L'exon 9 du gène de PTEN code pour une protéine de 403 acides aminés agissant comme un gène suppresseur de tumeurs. Il contient des motifs structuraux et fonctionnels dont le domaine phosphatase positionné en N-terminal (a.a. 7-186) (Li et al. 1997a), le domaine catalytique C2 (a.a. 186-352) (Lee et al. 1999) et la queue présente en C-terminal contenant de multiples sites de phosphorylation, un domaine de liaison PSD-95/Dlg/ZO-1 (PDZ) (a.a. 352-403) qui est important lors des interactions protéine-protéine (Adey et al. 2000) et un domaine PEST (proline, glutamic acid, serine) qui régule la stabilité de la protéine (Fig.1.7). Cependant, il suffit seulement des acides aminés situés entre la position 10 et 353 pour permettre à la protéine PTEN d'exercer ses diverses fonctions. Les 50 derniers acides aminés dans le domaine C-terminal (a.a. 354-403) sont nécessaires à maintenir la stabilité et à déterminer la localisation cellulaire de la protéine (Vazquez et al. 2000). De plus, il a été démontré que la phosphorylation en C-terminal inhibe l'activité de PTEN et diminue sa dégradation (Chung et al. 2005).

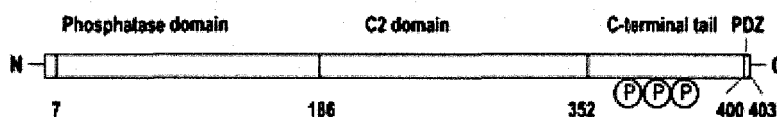


FIGURE 1.7 : Structure du gène suppresseur de tumeur PTEN tirée de Das,S. et al. "Membrane-binding and activation mechanism of PTEN", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 7491-7496 (2003).

Bien qu'il sera décrit dans la section 1.10.2 que l'exposition aux oestrogènes est le facteur clé menant à l'apparition du cancer de l'endomètre, diverses mutations peuvent également en être responsable. Dans la majorité des cas, il s'agit en fait d'une mutation atteignant l'intégrité du domaine phosphatase du gène suppresseur de tumeur PTEN (Fig.1.8) (Hale et al. 2002; Sun et al. 2001a). De plus, ce gène démontre des mutations et/ou délétions dans d'autres types de cancers, dont celui du sein et de la prostate (Chung et al. 2005) et sont observées dans 20% des cas d'hyperplasie de l'endomètre (Levine et al. 1998; Maxwell et al. 1998). Des mutations «Germ-line» dans le gène de PTEN sont également retrouvées dans le syndrome «Cowden and Bannayan-Riley-Ruvalcaba» et induit des prédispositions pour le développement des hyperplasies et carcinomes de l'endomètre, de même que lors de cancers de la thyroïde et du sein (Eng 1998). Il est

également reconnu que 100% des femelles souris ayant un caractère hétérozygote pour des mutations inactivant le gène PTEN démontrent des hyperplasies de l'endomètre avec des traits pathologiques similaires aux lésions précancéreuses humaines (Podsypanina et al. 1999; Stambolic et al. 2000).

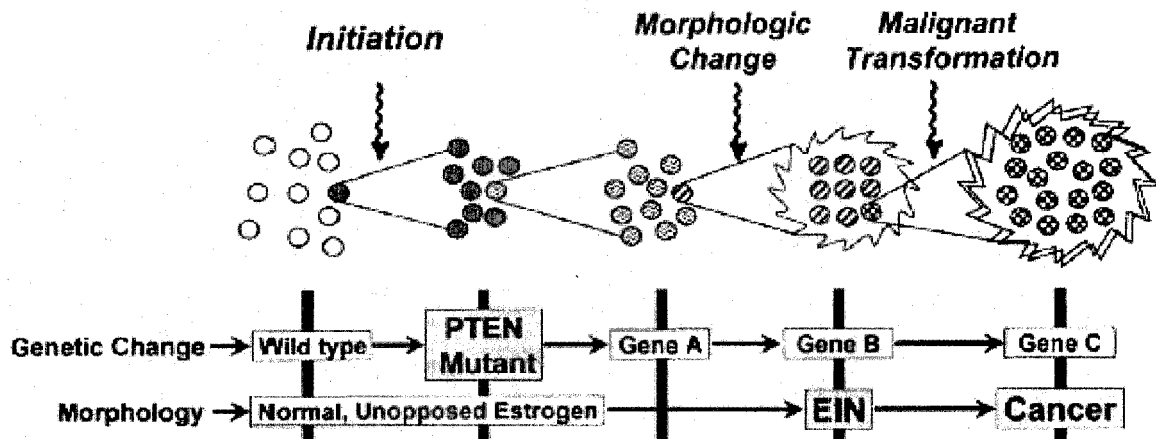


FIGURE 1.8 : Phénomènes génétiques menant à l'apparition d'un cancer de l'endomètre tirée de Fuller, A.F. et al. "Atlas of Clinical Oncology, Uterine Cancer", 1^{ère} édition, BC Decker Inc., Hamilton : 230 (2004).

Malgré le fait que le domaine phosphatase soit impliqué directement dans la liaison électrostatique avec la membrane plasmique, il a été démontré que la présence du domaine C2 est essentielle pour que cette liaison soit effectuée avec une haute affinité (Das et al. 2003). De façon plus importante, la phosphorylation dans les résidus sérine 380, thréonine 382 et thréonine 383 positionnés dans le domaine C-terminal diminue dramatiquement le taux d'association de PTEN avec la membrane plasmique, possiblement via l'interaction directe avec les résidus cationiques présents dans le domaine phosphatase bloquant ainsi leur interaction avec la surface anionique de la membrane plasmique. Il a également été démontré que la déphosphorylation de ces sites induit le recrutement de PTEN à la membrane grâce à l'exposition des résidus cationiques à la surface de la protéine, ce qui résulte en l'association rapide de PTEN à la membrane plasmique. De plus, lorsque cette association survient, PTEN est rapidement dégradé par un mécanisme de rétroaction négative. Ainsi, la queue C-terminale ne régule pas l'activité de PTEN en modulant directement sa stabilité, mais en

augmentant sa liaison avec la membrane plasmique, ce qui mène à une dégradation protéolytique rapide de la protéine (Das et al. 2003).

1.6.2 Les fonctions biologiques de PTEN

Bien que la protéine PTEN démontre des homologies avec les membres de la famille PTPs (protein tyrosine phosphatase) (section 1.8), sa fonction principale est d'être impliquée dans la régulation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt (Vivanco et Sawyers 2002; Wu et al. 1998). En fait, PTEN déphosphoryle le PI-3,4,5-P₃, résultant en l'inactivation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt (Fig.1.5, page 16) (Maehama et Dixon 1998). Ainsi, il a été démontré que les cellules embryonnaires et tumorales dérivées des souris PTEN +/- ont une augmentation de l'activation de Akt, qui est associée avec une activation de P70s6K (Podsypanina et al. 2001). De plus, il a été démontré que l'expression ectopique de PTEN *wild-type* chez les lignées cellulaires *PTEN-null* résulte en l'arrêt de la croissance cellulaire en G₁ ou en l'apoptose dépendant du type cellulaire (Davies et al. 1999; Lu et al. 1999; Myers et al. 1998; Wu et al. 1998). De plus, des mutations/délétions de PTEN et l'activation de Akt ont été associées avec la résistance aux agents chimiothérapeutiques telle que la doxorubicine (Tanaka et al. 2000). La protéine PTEN joue également un rôle important dans la survie cellulaire et l'apoptose en inhibant la progression du cycle cellulaire via une diminution de la régulation de la cycline D1 (Chung et al. 2006) et permet l'arrêt du cycle cellulaire via une voie indépendante de Akt, soit par l'activation de p27, une protéine inhibant la progression du cycle cellulaire (Tsugawa et al. 2002; Weng et al. 2001).

1.7 Les inhibiteurs d'apoptose (IAPs)

1.7.1 Caractéristiques des membres de la famille des IAPs

Tout d'abord identifiée chez les virus d'insectes, la famille de protéines inhibiteurs d'apoptose (IAP) semble avoir été conservée tout au long de l'évolution, car elle démontre des homologies avec celle des mammifères, des mouches et des chenilles.

Les IAPs sont des protéines anti-apoptotiques intracellulaires qui jouent un rôle dans la survie cellulaire en modulant la voie de signalisation induisant la mort par apoptose. Cette famille inclue XIAP (hILP/MIHA/BIRC4) (X-linked inhibitor of apoptosis protein), cIAP-1 (hIAP-2/MIHB/BIRC2) (cellular inhibitor of apoptosis protein 1), cIAP-2 (hIAP-1/MIHC/BIRC3) (cellular inhibitor of apoptosis protein 2), NAIP (BIRC1) (neuronal apoptosis inhibitory protein), ILP-2 (Ts-IAP), Livin (ML-AIP/KIAP/BIRC7, Survivin/BIRC5) et BRUCE (BIRC6) (Fig.1.9) (Ambrosini et al. 1997; Kasof et Gomes 2001; Lin et al. 2000; Liston et al. 1996).

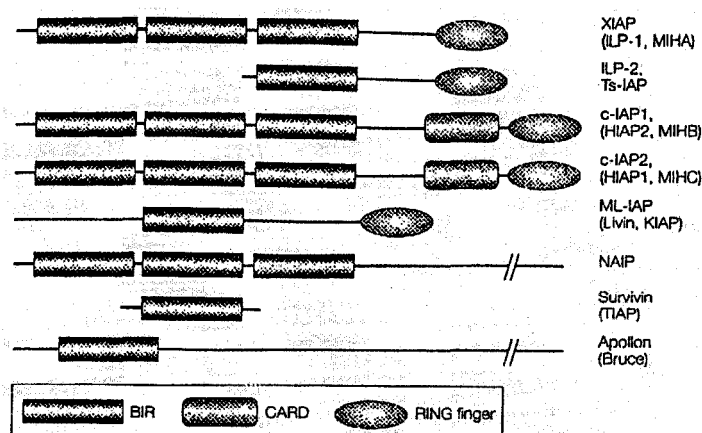


FIGURE 1.9 : Les différents membres de la famille des IAPs tirée de Salvesen, G.S. et al. "IAP protein: blocking the road to death's door", *Nature Reviews* 3: 401-410 (2002).

Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine hautement conservé d'environ 80 acides aminés identifié comme étant le domaine BIR (baculoviral inhibitory repeat). Le nombre de domaines BIR peut être variable, se situant entre une et trois copies; cependant ils sont toujours situés en N-terminal et sont indispensables pour l'activité anti-apoptotique des IAPs grâce à leur capacité à se lier et inhiber diverses caspases (Deveraux et al. 1997; Deveraux et al. 1999; Roy et al. 1997). XIAP, cIAP-1, cIAP-2 et NAIP sont reconnues pour posséder trois domaines BIR (BIR1, BIR2 et BIR3), tandis que ILP-2, Livin, Survivin et BRUCE n'en possèdent qu'une seule copie. Bien que la structure des gènes cIAP-1 et cIAP-2 soit sensiblement identique à celle de XIAP, ces protéines contiennent également un domaine de recrutement des caspases (CARD). À l'exception de NAIP, Survivin et BRUCE, les IAPs possèdent également un domaine RING en C-terminal probablement impliqué dans les interactions protéine-

protéine et protéine-acide nucléique (Fig.1.9). De plus, il a été démontré que le domaine RING de XIAP et cIAP-1 possède une activité E3 (ubiquitin protease ligase) responsable de l'autoubiquitination et de la dégradation des IAPs suite aux stimulus d'apoptose (Yang et al. 2000).

1.7.2 L'inhibition des IAPs

L'activité des protéines inhibitrices d'apoptose est régulée par un groupe de protéines qui se lient aux IAPs et inhibent leur activité anti-apoptotique (Salvesen et Duckett 2002; Shi 2002). Ce groupe de protéines est caractérisé par la présence en N-terminal d'un domaine conservé, le IBM (4-residue IAP-binding motif) qui se lie au domaine BIR des IAPs. Cette association prévient la liaison des IAPs avec les caspases et, dans certains cas, stimule leur propre dégradation (Chai et al. 2001; Holley et al. 2002; Ryoo et al. 2002; Srinivasula et al. 2001; Yoo et al. 2002). Chez les humains, trois protéines contenant le domaine IBM sont connues, soient Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) (Du et al. 2000; Verhagen et al. 2000), HtrA2/omi (Hegde et al. 2002; Suzuki et al. 2001; Van Loo et al. 2002) et GSPT1 (G₁ to S phase transition protein) (Hegde et al. 2003). Les deux premiers inhibiteurs d'IAPs, Smac et HtrA2, résident dans l'espace inter membranaire de la mitochondrie et sont relâchés dans le cytosol en réponse aux signaux apoptotiques. Cependant, GSPT1 est une protéine associée au réticulum endoplasmique. Ces trois protéines ont la capacité de potentialiser l'activation des caspases soit en prévenant la liaison IAPs-caspases ou en dissociant ce complexe (Hays et al. 2002), soit en stimulant l'ubiquitination des IAPs ainsi que l'apoptose.

XIAP peut également être régulée négativement par une autre protéine : XAF1 (XIAP-associated factor 1) (Liston et al. 2001). XAF1 réside dans le noyau des cellules et peut affecter la relocalisation de XIAP du cytoplasme vers le noyau. Celui-ci ne requiert aucune activation et semble interagir de façon constitutive avec XIAP inhibant ainsi son activité chez les cellules normales. Cependant, XAF1 n'est pas ou très peu exprimée chez les cellules cancéreuses (Liston et al. 2001).

1.7.3 Le rôle des IAPs

1.7.3.1 XIAP

La protéine XIAP est exprimée de façon constitutive dans le cytoplasme de plusieurs cellules et tissus humains (Liston et al. 1996) et est reconnue pour inhiber la mort cellulaire en réponse à divers stimuli d'apoptose (LaCasse et al. 1998). De tous les IAPs, XIAP est le plus important inhibiteur de caspases (Deveraux et al. 1997; Stennicke et al. 2002) et son expression est régulée par le facteur de transcription NF κ B (Stehlik et al. 1998). Grâce à son domaine BIR2, XIAP est un inhibiteur direct de la caspase-3 et de la caspase-7, tandis que son domaine BIR3 lui permet de moduler la voie de signalisation Bax/cytochrome c en inhibant la caspase-9 (Deveraux et al. 1998; Sun et al. 1999; Takahashi et al. 1998). Il est important de noter que la protéine Akt possède la capacité de phosphoryler XIAP, ce qui lui confère une protection contre son ubiquitination et sa dégradation (Dan et al. 2004).

1.7.3.2 cIAP1 et cIAP-2

Les domaines BIR des protéines cIAP-1 et cIAP-2 leur permettent d'inhiber l'apoptose via l'interaction avec la caspase-3, -7 et -9. Cependant, ils peuvent également se lier à TRAF1 et TRAF2 (TNF- α receptor associated factors 1 and 2), supprimant ainsi l'apoptose induite par la voie de signalisation du TNF- α (Wang et al. 1998b). L'expression de cIAP-1 et de cIAP-2 est augmentée à la suite de l'activation du facteur de transcription NF- κ B par le récepteur au TNF (Wang et al. 1998a). Par la suite, ces IAPs peuvent jouer un rôle en protégeant les cellules de l'apoptose induite par le TNF en réduisant l'activation de la caspase-8. Cependant, cette diminution ne survient pas grâce à une interaction entre cIAP-1 ou cIAP-2 avec cette caspase, puisque aucun IAPs ne peut directement inhiber la caspase-8 (Roy et al. 1997). En fait, ils peuvent agir en inhibant la caspase-3, prévenant ainsi une activation successive de la caspase-8.

1.7.3.3 NAIP

Le gène NIAP a été identifié pour la première fois grâce à sa délétion chez un patient souffrant d'atrophie musculaire spinale, un désordre neurodégénératif caractérisé par une déplétion de neurones moteurs via le procédé d'apoptose (Roy et al. 1995). La corrélation entre NIAP et cette pathologie suggère que la protéine NIAP peut être requise pour la survie des neurones et que des mutations dans le gène de NIAP contribuent à l'apparition de la maladie.

1.7.3.4 ILP-2

La protéine ILP-2 possède une région C-terminale très similaire à celle de XIAP, ce qui lui permet d'être elle aussi un inhibiteur de caspases, mais seulement pour la caspase-9 (Shin et al. 2005). ILP-2 est retrouvée seulement chez les primates (Richter et al. 2001) et est reconnue pour être une molécule très instable. En fait, pour qu'elle puisse se retrouver dans les cellules sous une forme plus stable, la protéine ILP-2 se doit de former un complexe avec Smac, ce qui lui permet d'inhiber cette protéine inhibitrice des IAPs.

1.7.3.5 Livin

À ce jour, deux isoformes de Livin sont connus. Il s'agit de Livin α , qui est la forme longue, et de Livin β qui est la forme courte. Chez l'adulte, l'expression abondante de Livin α et β a été détectée dans le cœur, le placenta, l'ovaire, les poumons et la rate de même que chez les patients souffrant d'un cancer de la peau, du colon et de la prostate. Bien que Livin ait seulement un domaine BIR, cette protéine est reconnue pour interagir et inhiber la caspase-3, -7 et -9. Cependant, cette inhibition est de beaucoup inférieure à celle effectuée par XIAP. Livin possède également de fortes propriétés anti-apoptotiques qui lui sont attribuables par le fait qu'elle est un puissant inhibiteur de Smac (Vucic et al. 2005) et grâce à sa capacité d'augmenter les niveaux de Bax.

1.7.3.6 Survivin

La protéine Survivin est un membre unique de la famille des IAPs, car elle exerce deux fonctions importantes. Elle peut contrôler la stabilité et l'assemblage des microtubules, agissant ainsi sur la division cellulaire (Giodini et al. 2002; Shin et al. 2001) ou inhiber directement l'apoptose en se liant à Smac (Altieri 2003). L'expression de Survivin a été reconnue pour être associée avec la carcinogenèse, la progression du cancer, la résistance aux drogues et un faible taux de survie chez les patients (Li 2003). L'inhibition de l'expression de Survivin et/ou de sa fonction induit l'apoptose (Ambrosini et al. 1998; Grossman et al. 1999; Li et al. 1998; O'Connor et al. 2000; Olie et al. 2000), de même que des défauts au niveau de la division cellulaire (Chen et al. 2000; Li et al. 1999). Bien qu'elle soit exprimée dans plusieurs types de cancers dont celui du sein, du colon, du pancréas et de la prostate, la protéine Survivin est absente dans la plupart des tissus humains adultes (Ambrosini et al. 1997; Zangemeister-Wittke et Simon 2004). L'expression de Survivin est induite par des facteurs angiogéniques dont le VEGF, le FGF (fibroblast growth factor) et l'angiopoïétine-1 et est augmentée lors de la phase G₂/M du cycle cellulaire (Li et Altieri 1999), ce qui peut expliquer son niveau élevé dans les tumeurs (Papapetropoulos et al. 2000; Tran et al. 1999). D'ailleurs, l'augmentation de son expression est un facteur de mauvais pronostic dans divers types de cancers (Kawasaki et al. 1998; Monzo et al. 1999; Nakagawara 1998).

1.7.3.7 BRUCE

BRUCE se lie de façon périphérique à la membrane du TGN (trans-Golgi network) et à d'autres structures vésiculaires (Hauser et al. 1998). Des études récentes ont démontré que BRUCE est essentiel pour inhiber l'apoptose induite par Smac en promouvant l'ubiquitination et la dégradation de Smac mature (Hao et al. 2004; Qiu et Goldberg 2005). Bien que la protéine BRUCE se lie à la pro-caspase-9 et inhibe son activation, elle peut également inhiber l'activité de la forme mature de la caspase-9. Cependant, aucune interaction de BRUCE avec la caspase-3 n'a été identifiée à ce jour.

1.8 Les phosphatases tyrosines et alcalines

1.8.1 Généralités

L'une des pierres angulaires du signal intracellulaire est la capacité des protéines à être phosphorylées et déphosphorylées de façon réversible par les protéines kinases et les phosphatases respectivement. Les phosphorylations peuvent altérer les protéines cibles en induisant un changement de conformation, en créant un site de liaison pour d'autres protéines ou en causant une relocalisation intracellulaire. Les phosphotyrosines, qui totalisent environ 0,1% des acides aminés phosphorylés cellulaires totaux, jouent un rôle important dans le signal cellulaire (Stoker 2005).

1.8.2 La phosphorylation des tyrosines

La phosphorylation des tyrosines est un mécanisme fondamental pour plusieurs aspects importants de la physiologie des eucaryotes, de même que pour la santé et les maladies humaines (Hunter 1987; Mustelin et al. 2002b; Mustelin et al. 2002a). Lorsque comparée avec la phosphorylation des protéines en général, celle des tyrosines est présente seulement chez les eucaryotes multicellulaires. Ce type de phosphorylation est utilisé pour la communication, le maintien de la forme cellulaire, la motilité cellulaire, la décision de prolifération versus différenciation, la régulation de la transcription des gènes et le transport de molécules à l'intérieur ou à l'extérieur de la cellule. La phosphorylation des tyrosines joue également un rôle important dans la coordination de ces procédés entre les cellules voisines lors de l'embryogenèse, le développement des organes, l'homéostasie des tissus et le système immunitaire.

Il a été démontré que les tyrosines kinases cytoplasmiques ou les récepteurs tyrosines kinases représentent plus de 80% des toutes les oncoprotéines, ce qui démontre le rôle essentiel joué par les tyrosines kinases dans la régulation des fonctions cellulaires. Le facteur oncogénique peut résulter en la surexpression du gène normal ou en une mutation qui rend l'enzyme activée de façon constitutive. De plus, des évidences

démontrent que l'étape clé du déclenchement du cycle cellulaire est régulée par la phosphorylation de tyrosines (Dunphy et Newport 1989; Gould et Nurse 1989; Huber et al. 2004; Morla et al. 1989). Le niveau et le moment de phosphorylation des tyrosines est gouverné à la fois par les tyrosines kinases (PTK) et les phosphatases (PTPs). Étant donné qu'il a été démontré que des anomalies survenant lors de la phosphorylation des tyrosines jouent un rôle dans le développement de diverses maladies dont le cancer du colon (Ostman et al. 2006), nous avons choisi de cibler nos recherches sur les PTPs. Ainsi, cette section traitera seulement de ce type de protéines.

1.8.2.1 Les familles de PTPs

Les premiers membres de la famille des PTPs ont été isolés à partir du placenta humain (Huber et al. 2004; Tonks et al. 1988a; Tonks et al. 1988b). Sur la base de la séquence en acides aminés de leur domaine catalytique, les PTPs peuvent être classés en quatre groupes distincts, chacun ayant sa propre spécificité pour un substrat (Alonso et al. 2004; Huber et al. 2004; Ostman et al. 2006; Raugei et al. 2002). La classe I comporte les phosphatases dites classiques ayant une spécificité pour les phosphotyrosines seulement. La classe II est la plus grande classe des PTPs avec 61 membres et comprend les phosphatases à double spécificité (VH1-like DSPs). Pour ce qui est de la classe III, il s'agit des phosphatases à faible poids moléculaires (LMW-PTPs) ayant une spécificité unique pour les phosphotyrosines. Enfin, la classe IV des PTPs comporte les protéines Eya utilisant un mécanisme catalytique différent avec un acide aspartique important et une dépendance aux cations. De plus, il a récemment été démontré que ces phosphatases ont une spécificité à la fois pour les phosphotyrosines et les phosphosérines-phosphotyrosines. Il est à noter que toutes les PTPs démontrent dans leur site actif un motif cystéine-arginine séparé par cinq acides aminés (Stone et Dixon 1994) et que celui-ci est critique pour l'activité enzymatique, puisqu'une mutation dans ce motif résulte en la perte totale de l'activité des PTPs (Pot et al. 1991; Streuli et al. 1989). De plus, lors de l'isolation du domaine catalytique de la plupart des PTPs, il a été démontré que l'activité enzymatique doit être inhibée afin qu'il y ait une régulation complète de ces protéines. Un tel rôle peut être joué par un domaine de régulation

attaché aux domaines catalytiques. Pour les PTPs contenant un domaine SH2, soit SHP-1 et SHP-2, plusieurs évidences supportent la notion que le N-terminal du domaine SH2 inhibe l'activité catalytique, plus spécifiquement en se liant au domaine PTP et en bloquant l'accès des substrats au site catalytique. Le recrutement des substrats phosphorylés par le domaine SH2 atténue cette inhibition, ce qui permet une activation concomitante de l'activité des PTPs (Barford et al. 1998).

1.8.2.1.1 Classe I : Les PTPs classiques

Les 38 membres de la classe des PTPs classiques spécifiques aux tyrosines peuvent être divisés en deux autres groupes: celui comprenant les phosphatases transmembranaires, soit les «receptor-like PTPs» (RPTPs) et celui incluant les phosphatases intracellulaires, soit les «nonreceptor-like PTPs» (NRPTPs) (Guan et Dixon 1991). Les membres de la famille RPTP sont composés d'un domaine transmembranaire et de plusieurs domaines extracellulaires variables. Dans la majorité des cas, les domaines extracellulaires incluent le domaine «immunoglobulin-like» et le domaine «fibronectin type III», et sont en fait similaires aux domaines extracellulaires des molécules d'adhésion cellulaire (Fig.1.10). La portion intracellulaire, quant à elle, contient deux domaines cytoplasmiques PTPase organisés en tandem. Cette famille comporte 21 gènes dont *CD45* et *LAR* (Fig.1.10) (Alonso et al. 2004). Pour ce qui est de la famille des NRPTPs composée de 17 gènes dont *PTP1B*, *SHP1* et *SHP2*, les membres démontrent une diversité structurelle frappante et contiennent régulièrement des séquences indiquant leur localisation cellulaire, ce qui leur permet une liaison aux protéines cibles (Fig.1.10) (Mauro et Dixon 1994).

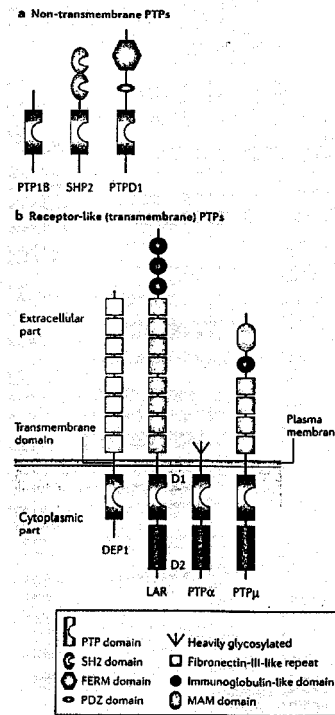


FIGURE 1.10 : Représentation schématique de quelques PTPs classiques tirée de Ostman,A. et al. "Protein-tyrosine phosphatases and cancer" *Nature Reviews Cancer* 6 : 307-320 (2006).

1.8.2.1.2 Classe II : Les phosphatases à double spécificité

Pour ce qui est des 61 phosphatases à double spécificité (VH1-like DSPs), il s'agit du groupe de phosphatases le plus diversifié en terme de spécificité aux substrats, car comme son nom l'indique, ce groupe n'est pas spécifique aux phosphotyrosines, mais peut également déphosphoryler les phosphothréonines, les phosphosérines et le PIP₃. Ces enzymes peuvent également être divisées en huit différents groupes basés selon leur spécificité aux substrats. Le groupe I représente onze phosphatases reconnues pour être spécifiques aux MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Keyse 1998; Saxena et Mustelin 2000). La famille des MAPK comprend les sous-groupes de protéines ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK (c-jun N-terminal kinase) et p38 et est reconnue pour jouer un rôle fondamental dans la survie et la prolifération cellulaire de même que dans l'induction de l'apoptose (Lee et al. 2006b). Ainsi, les phosphatases du groupe I, les MKPs (MAPK-phosphatase), sont caractérisées par une double spécificité pour les phosphotyrosines et les phosphothréonines et par la présence d'une région CH2

(CDC25 homology domain) et d'autres motifs permettant leur liaison aux MAPK (Alonso et al. 2003; Bordo et Bork 2002). Le groupe II est référé pour être des VH1-like DSP atypiques et inclu une variété d'enzymes peu caractérisées n'ayant aucun motif de liaison pour les MAPK. Ces phosphatases semblent être les plus petites enzymes de la classe, car elles ont moins de 250 résidus d'acides aminés. Le troisième et le quatrième groupe sont représentés par trois SSH (Slingshots) et trois PRL (phosphatase of regenerating liver), respectivement. Les SSH ont comme substrats les phosphosérines et sont reconnues pour inhiber la réorganisation de l'actine grâce à leur liaison avec cette dernière (Niwa et al. 2002). Pour ce qui est des PRL, celles-ci ont comme substrats les phosphotyrosines et jouent un rôle dans la prolifération cellulaire, l'invasion et la mobilité (Stephens et al. 2005). Pour ce qui est du groupe V, il s'agit des CDC14 et inclu la protéine KAP (kinase-associated phosphatase) qui est impliquée dans la déphosphorylation de diverses Cdk (cyclin dependent kinase) menant ainsi à l'arrêt de la mitose (Visintin et al. 1998). Le groupe VI comprend les trois régulateurs du cycle cellulaire humains, CDC25A, CDC25B, CDC25C. Leur fonction est de déphosphoryler les motifs N-terminaux de la tyrosine et de la thréonine. Cette action est requise pour l'activation de ces kinases afin de permettre la progression du cycle cellulaire (Honda et al. 1993). Enfin, les deux derniers groupes, PTEN et les «myotubularins» sont spécifiquement impliqués dans la déphosphorylation du phosphate en position D3 des phospholipides inositols (Wishart et Dixon 2002).

1.8.2.1.3 Classe III : Les phosphatases à faible poids moléculaire

La famille des phosphatases à faible poids moléculaire (LMW-PTP) représente des enzymes de 18 kDa impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et ayant été hautement conservées lors de l'évolution. Cette préservation au cours de l'évolution et la corrélation d'un variant LMW-PTP avec diverses pathologies (Bottini et al. 2002), telles que l'arthrite rhumatoïde, l'asthme, le diabète, la cardiomyopathie et l'Alzheimer, indiquent que les phosphatases à faible poids moléculaire sont fortement impliquées dans la régulation d'un ou de plusieurs procédés fondamentaux dans la physiologie cellulaire. En effet, il a été démontré que les LMW-PTPs s'associent et déphosphorylent

plusieurs récepteurs aux facteurs de croissance menant ainsi à la division cellulaire (Raugei et al. 2002). L'activité des LMW-PTPs dépend à la fois de sa localisation cellulaire et de sa régulation par phosphorylation ou par oxydation.

1.8.2.1.4 Classe IV : Les Eya

À ce jour, seulement les quatre gènes Eya ont été identifiés pour faire partie de la quatrième classe des PTPs. Cette classe de phosphatases a été reconnue pour jouer un rôle important dans le développement (Li et al. 2003; Rayapureddi et al. 2003; Satow et al. 2002; Tootle et al. 2003) et dans la morphologie nucléaire (Siniosoglou et al. 1998). Il est à noter que l'ARN polymérase II est un membre de cette famille.

1.8.3 Les phosphatases alcalines et acides

Les phosphatases alcalines sont reconnues pour être une classe d'enzymes ayant une faible spécificité pour leurs substrats (Kaplan 1972). Elles sont présentes dans plusieurs tissus incluant les os, les intestins, les reins, le foie, le placenta, l'endomètre et les globules blancs. Les phosphatases alcalines catalysent l'hydrolyse des phosphates esters lorsque les conditions offrent un pH supérieur à 7. Elles attaquent donc le groupe phosphoryl positionné sur la sérine 102 afin de générer une enzyme intermédiaire (Engstrom 1962), qui sera subséquemment hydrolysée afin de donner une enzyme nouvelle (Ghosh et al. 1986). Chez le rat et le singe, il a été démontré que l'activité des phosphatases alcalines présente au niveau de l'utérus peut être régulée par les hormones ovariennes (Holinka et al. 1977; Holinka et Finch 1977; Holinka et Gurpide 1979). De plus, chez les lignées de cellules cancéreuses répondant aux oestrogènes, comme les Ishikawa, l'équipe de Littlefield et al. (1990) a observé que les œstrogènes augmentent fortement l'activité des phosphatases alcalines, tandis que les autres stéroïdes n'exercent aucun effet sur cette activité (Littlefield et al. 1990).

Les phosphatases acides ont été décrites pour la première fois chez les érythrocytes en 1924 (Henneberry et al. 1979). Leur activité a par la suite été démontrée dans l'urine de

l'homme, toutefois, il a été établi qu'elle provenait de la prostate. Ces enzymes ont la capacité de catalyser une réaction similaire aux phosphatases alcalines, mais à un pH qui doit être inférieur à 7. De plus, elles impliquent plutôt la formation d'enzymes intermédiaires composées de phosphohistidines covalentes. Étant donné qu'il a été démontré que les phosphatases acides se retrouvent en très grande quantité dans le sérum des patients atteints d'un cancer de la prostate, particulièrement ceux ayant des métastases osseuses, la présence de telles phosphatases dans le sérum a été établie comme étant le premier marqueur de tumeur chez l'homme (DiPaolo et Rival 1982). À l'heure actuelle, de nombreuses pathologies démontrent une élévation des niveaux de l'activité des phosphatases acides, cependant, aucune corrélation entre le cancer de l'endomètre et ces enzymes n'a été établie.

Maintenant que la description des protéines à l'étude est terminée, une description approfondie de l'anatomie féminine et du cancer de l'endomètre vient compléter le volet introduction de cette thèse.

1.9 La physiologie utérine

1.9.1 Généralités

L'utérus humain constitue le siège de la menstruation, de l'implantation du blastocyste, du développement du fœtus pendant la grossesse ainsi que l'accouchement. Il se situe entre la vessie et le rectum et a la grosseur et la forme d'une poire renversée (Fig.1.11) (Tortora et Grabowski 2001). L'utérus se divise en trois parties anatomiques : 1) le fundus de l'utérus qui constitue la partie arrondie situé au-dessus des trompes utérines, 2) le corps de l'utérus, partie centrale effilée et 3) le col de l'utérus qui est la partie inférieure étroite qui s'ouvre dans le vagin. Au niveau histologique, l'utérus comprend trois couches de tissus : la couche externe, le périmétrium, la couche moyenne, le myomètre et la couche interne, l'endomètre. Le périmétrium est une séreuse faisant partie du péritoine viscéral. Il est composé d'un épithélium pavimenteux simple et d'un tissu conjonctif aréolaire. Le myomètre est constitué de trois feuillets de fibres

musculaires lisses. Son épaisseur diminue du fundus de l'utérus jusqu'au col. Sa couche moyenne plus épaisse est circulaire, tandis que ses couches internes et externes sont longitudinales et obliques. Enfin, l'endomètre est composé d'une couche interne d'épithélium prismatique simple qui recouvre la lumière utérine. Les cellules de cet épithélium portent d'ailleurs le nom de cellules épithéliales luminales. L'endomètre est également constitué d'un stroma sous-jacent très épais fait de chorion (tissu conjonctif aréolaire), dont les cellules portent le nom de cellules stromales. Enfin, l'endomètre renferme également des glandes utérines, constituées de cellules épithéliales glandulaires, qui s'invaginent dans l'épithélium intracavitaire et se terminent à proximité du myomètre. En résumé, l'endomètre est constitué de deux couches importantes : une couche fonctionnelle qui tapisse la cavité utérine et se desquame au cours de la menstruation et une couche basale permanente qui permet la régénérescence de la couche fonctionnelle après chaque menstruation (Tortora et Grabowski 2001).

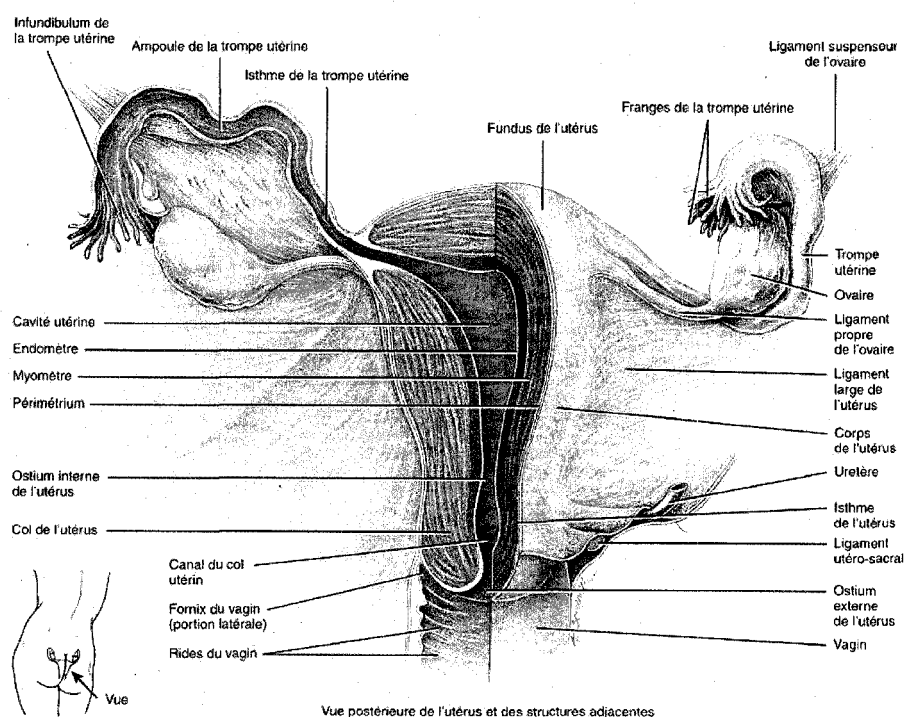


FIGURE 1.11 : Anatomie de l'utérus tirée de Tortora, G.J. et Grabowski, S.R. "Principes d'anatomie et de physiologie", traduction de la 9^e édition anglaise, Éditions du renouveau pédagogique, Saint-Laurent : 1121 pages (2001).

1.9.2 Le cycle menstruel

Le cycle menstruel se définit comme étant une série concomitante de changements que subit l'endomètre en vue de l'arrivée d'un ovule fécondé. La durée du cycle varie habituellement entre 24 et 35 jours et comprend quatre phases : la phase menstruelle, la phase préovulatoire, l'ovulation et la phase proliférative (Fig.1.12) (Tortora et Grabowski 2001). La phase menstruelle également appelée menstruations se déroule durant les cinq premiers jours du cycle environ. Le flux menstruel est provoqué par une diminution de la concentration d'hormones ovariennes, en particulier de la progestérone, qui stimulent la libération des prostaglandines causant la constriction des artérioles spiralées de l'utérus. Les cellules irriguées par celles-ci manquent ainsi d'oxygène et commencent à mourir. Peu à peu, toute la couche fonctionnelle de l'endomètre se desquame ce qui induit une diminution considérable de son épaisseur, puisqu'il ne reste plus que la couche basale (Tortora et Grabowski 2001).

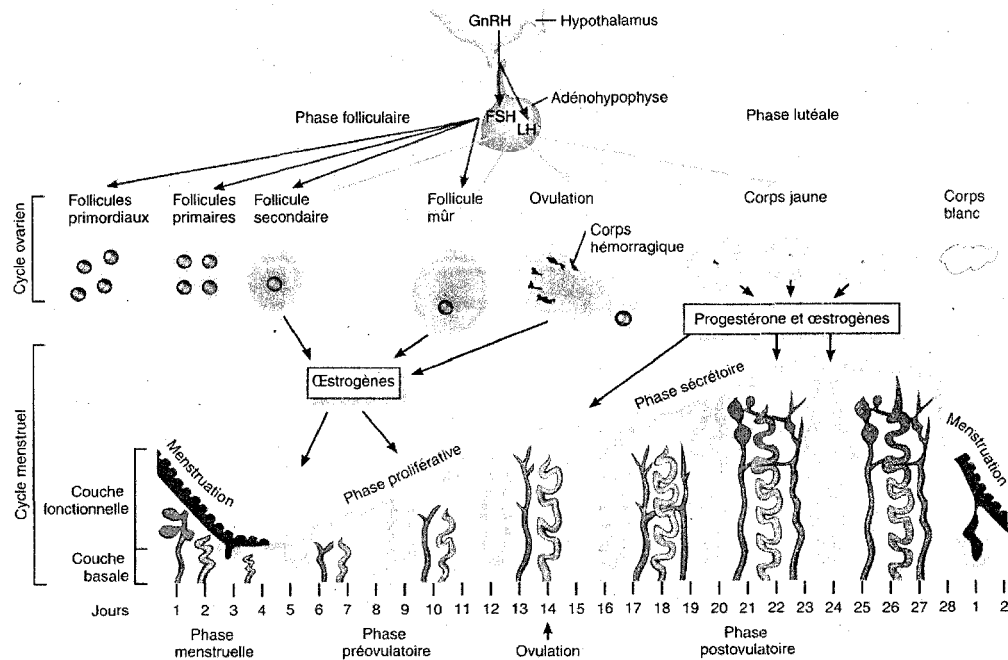


FIGURE 1.12 : Cycle menstruel chez la femme tirée de Tortora, G.J. et Grabowski, S.R. "Principes d'anatomie et de physiologie", traduction de la 9^e édition anglaise, Éditions du renouveau pédagogique, Saint-Laurent : 1121 pages (2001).

La phase préovulatoire, est la deuxième phase du cycle et sa durée est plus variable que celle des autres phases et détermine en grande partie la durée de l'ensemble du cycle.

Elle s'étend du jour six au jour treize. Les oestrogènes libérés dans le sang par les follicules ovariens immatures stimulent la reconstruction de l'endomètre; les cellules de la couche basale subissent la mitose et produisent une nouvelle couche fonctionnelle. À mesure que l'endomètre s'épaissit, des glandes utérines courtes et droites s'y forment et les artérioles qui pénètrent dans la couche fonctionnelle s'enroulent et allongent. Cette phase est également appelée phase proliférative, car elle correspond à la prolifération de l'endomètre. L'ovulation est la libération dans la cavité pelvienne de l'ovocyte secondaire. Cependant, durant cette phase, aucune action au niveau de l'utérus n'est observée. Enfin, en ce qui concerne la phase postovulatoire, sa durée est la plus constante du cycle et est de 14 jours. La progestérone et les oestrogènes produits par le corps jaune favorisent la croissance et l'enroulement des glandes utérines, la vascularisation de la couche superficielle de l'endomètre, l'épaississement de celui-ci et l'augmentation de la quantité de liquide dans les tissus (Fig.1.12). Ces changements préparatoires culminent environ une semaine après l'ovulation, moment qui correspond à l'activité possible d'un ovule fécondé. Dans le cycle menstruel, cette phase est également nommée phase sécrétoire, car elle coïncide avec l'activité sécrétoire des glandes utérines. Si aucun ovule n'est fécondé, la dégénérescence du corps jaune survient ce qui engendre une diminution des niveaux de progestérone et, par conséquent, la menstruation (Tortora et Grabowski 2001).

1.10 Le cancer de l'utérus

1.10.1 Généralités

À l'échelle mondiale, le cancer de l'utérus, également nommé cancer de l'endomètre, est au premier rang en incidence entre les cancers gynécologiques et au quatrième rang parmi tous les types de cancer (Parkin et al. 2005). Au Canada, il se situe derrière le cancer du sein, du poumon et du colon (Société canadienne du cancer 2007). Celui-ci peut être divisé en deux types histologiques. Le type I est appelé endométrioïde et 85% des cancers de l'endomètre en font partie. Les tumeurs de ce type surviennent habituellement chez les femmes pré- ou ménopausées et sont généralement de faible stade et associées avec l'exposition aux oestrogènes (Ryan et al. 2006). La progression

du cancer implique également la présence d'événements génétiques, dont la perte de fonction du gène suppresseur de tumeurs PTEN qui survient dans 55%-83% des cas (Fig.1.13) (Fuller et al. 2004). De plus, lors de cancer de l'endomètre de type endométrioïde, les cellules sont définies comme étant mieux différenciées et le cancer est moins agressif (Deligdisch et Holinka 1987). Au niveau histologique, ce type de cancer est caractérisé par des glandes devenues anormales qui infiltrent la lumière utérine (Fig.1.14). Le type I du cancer de l'endomètre coexiste ou est précédé par une hyperplasie complexe et atypique de l'endomètre et démontre un bon pronostique (Matias-Guiu et al. 2001).

Gene	Alteration	Endometrioid (%)	Nonendometrioid (%)
<i>P53</i>	Mutation	5-10	80-90
<i>PTEN</i>	Loss of function	55-83	11
<i>K-ras</i>	Mutational activation	13-26	0-10
<i>β-Catenin</i>	Mutation (immunoreactive)	25-38	Rare
<i>MLH1</i>	Microsatellite instability (epigenetic silencing)	17	5
<i>P27</i>	Loss of function	68-81	76
<i>Cyclin D1</i>	Increased expression	41-56	19
<i>P16</i>	Loss of function	20-34	10
<i>RB</i>	Loss of function	3-4	10
<i>BCL2</i>	Loss of function	65	67
<i>BAX</i>	Loss of function	48	43
Estrogen and progesterone receptors	Positive immunoreactivity	70-73	19-24

FIGURE 1.13 : Altération de certains gènes lors de cancer de l'endomètre tirée de Fuller, A.F. et al. "Atlas of Clinical Oncology, Uterine Cancer", 1^{ère} édition, BC Decker Inc., Hamilton : 230 pages (2004).

Le type II du cancer de l'endomètre est décrit comme étant non-endométrioïde et n'est pas en lien avec les facteurs hormonaux (Deligdisch et Holinka 1987). Il se développe habituellement chez les femmes âgées post ménopausées et survient occasionnellement lors de lésions précancéreuses qui se développent chez l'endomètre atrophique (Matias-Guiu et al. 2001). Il s'agit principalement de carcinomes de haut stade (IV) démontrant une morphologie de cellules claires et est décrit comme étant un type de cancer très agressif et ayant un mauvais pronostique (Ryan et al. 2006). Lors d'un cancer de l'endomètre de type non-endométrioïde, ce sont plutôt des altérations au niveau du gène suppresseur de tumeur p53 qui sont responsables de ce type de cancer avec une incidence de 80%-90% (Fig.1.13) (Fuller et al. 2004). Notre étude détermine les différences qu'il peut y avoir entre des lignées du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN sauvage ou celles ayant la protéine PTEN mutée. Ainsi, les termes

«cancer de l'utérus» et «cancer de l'endomètre» utilisés dans cette thèse feront référence au type I ou endométrioïde.

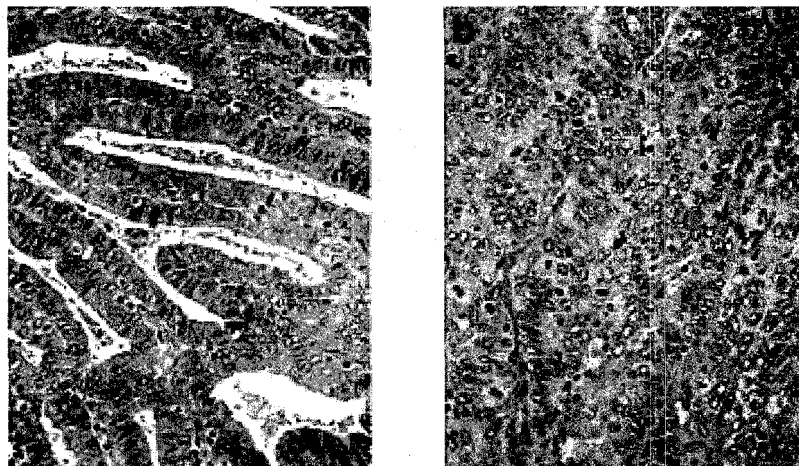


FIGURE 1.14 : Coupe histologie de carcinomes endométrioïdes de l'utérus de grade I (a) et grade III (b) tirée de Ryan, A.J. et al. "Endometrial cancer", Cell Tissue Res. 322 : 53-61 (2006).

1.10.2 L'étiologie et les facteurs de risque

Plusieurs facteurs sont reconnus pour être impliqués dans le développement du cancer de l'endomètre. Cependant, tous ces facteurs sont liés à l'exposition aux oestrogènes. Dès l'apparition des études cliniques et épidémiologiques, l'obésité a été reconnue pour être un haut facteur de risque pour ce type de cancer (Damon 1960; Fox et Sen 1970). Une vaste étude a d'ailleurs démontré qu'il existe une relation entre le risque de cancer de l'endomètre et l'augmentation de l'indice de masse corporelle. En effet, le risque relatif augmente de 9% pour chaque kg/m^2 d'unité de masse corporelle (Weiderpass et al. 2000). Le lien entre l'obésité et le cancer de l'endomètre s'explique par le fait que les tissus adipeux possèdent des enzymes aromatasases capable de convertir l'androstènedione en oestrone, un oestrogène actif (MacDonald et Siiteri 1974; Rizkallah et al. 1975). De plus, la nulliparité de même que l'âge des premières règles et de la ménopause sont considérés comme étant des facteurs de risque et leur implication dans le développement du cancer de l'endomètre est lié au temps d'exposition aux oestrogènes. En addition à la nulliparité, il a été démontré que plusieurs grossesses diminuent le risque de développement du cancer, de même que l'âge de cette dernière

(Lambe et al. 1999; Salazar-Martinez et al. 1999). Le temps d'allaitement joue également un rôle protecteur, puisque la lactation est associée avec de faibles niveaux d'oestrogènes (Newcomb et Trentham-Dietz 2000; Petrakis et al. 1987; Rosenblatt et Thomas 1995). L'utilisation de contraceptifs oraux contenant à la fois des oestrogènes et de la progestérone diminue également les risques de cancer de l'endomètre, et ce, de façon dépendante de la dose, car plus le temps d'utilisation est long, plus faibles sont les risques (Vessey et Painter 1995; Voigt et al. 1994; Weiderpass et al. 1999). Les facteurs héréditaires peuvent également être impliqués dans le développement du cancer de l'endomètre puisqu'approximativement 10% des cas sont considérés comme étant de nature familiale. Ainsi, les cancers engendrés par des prédispositions génétiques peuvent être positionnés dans une troisième classe, car ce type de cancer peut être en lien avec l'exposition aux oestrogènes, comme il peut ne pas être induit par une telle exposition (Sandles et al. 1992). La relation entre un cancer de l'endomètre et le facteur héréditaire la plus documentée à l'heure actuelle est la présence d'un cancer colorectal héréditaire ne démontrant aucune polype, le HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer). Ainsi, les femmes démontrant des mutations au niveau des gènes associées au cancer HNPCC, soient les gènes de réparation de l'ADN *MLH1*, *MSH2* et *MSH6*, voient leur risque augmenté par un facteur 10 (Lynch et al. 1998; Ryan et al. 2006).

1.10.3 Les manifestations et le diagnostic

Les saignements anormaux hors du cycle menstruel ou chez les femmes post ménopausées sont l'un des symptômes les plus communs lors d'un cancer de l'endomètre et sont généralement considérés comme un indicateur de la présence de cancer chez la plupart des patientes (Kufe et al. 2003). De plus, les femmes souffrant de ce type de cancer peuvent avoir des douleurs ou un inconfort au niveau de la région pelvienne.

Le diagnostic se pose à l'aide d'une biopsie démontrant un endomètre prolifératif et confirme le diagnostic clinique. Cependant, si tel n'est pas le cas, la patiente peut subir une dilatation fractionnée ou un curettage de l'utérus. Le diagnostic à l'aide de

l'ultrasonographie pelvienne ou l'hystéroscopie est réservé aux patientes ayant des résultats anormaux lors de la biopsie (Kufe et al. 2003).

1.10.4 La stadification

Une fois que le diagnostique est confirmé, il faut déterminer le stade du cancer, ce qui permettra de choisir un traitement plus efficace. Le stade dépend de la taille de la tumeur, de même que de son degré de propagation dans l'organisme (Société canadienne du cancer 2007). C'est la Fédération Internationale de Gynécologie et Obstétrique (FIGO) qui a établi les modalités permettant de caractériser le stade d'un cancer endométrial. Pour déterminer le stade de la tumeur, les patientes doivent subir une hystérectomie totale combinée avec une salpingo-ovariectomie bilatérale, des lavements pour examens cytologiques et une biopsie des tissus suspects avoisinants (Kufe et al. 2003). Il existe quatre stades pour le cancer de l'endomètre, allant du stade I au stade IV (Fig.1.15). Dans 75% des cas, le cancer de l'endomètre est de stade I et le taux de survie à 5 ans est de 75%, tandis que 13% des patientes atteintes de cette maladie ont un cancer de stade II (Pectasides et al. 2006), dont l'espérance de vie à 5 ans se situe entre 67,1% et 76,9%. Pour ce qui est du taux de survie à 5 ans pour le stade III, il se situe entre 31,7% et 60,3% et celui du stade IV, est de 5,3% à 20,1% (Pectasides et al. 2006).

Stade	Étendue du cancer
IA	Endomètre seulement
IB	Invasion inférieure ou égale à la moitié du myomètre
IC	Invasion supérieure à la moitié du myomètre
IIA	Invasion glandulaire du col
IIB	Invasion du stroma du col
IIIA	Atteinte de la séreuse et/ou cytologie péritonéale positive et/ou atteinte des annexes
IIIB	Métastases vaginales Métastases pelviennes et/ou atteinte des ganglions lombo-aortiques
IVA	Atteinte de la muqueuse de la vessie et/ou du rectum
IVB	Métastases à distance incluant des atteintes ganglionnaires abdominales et/ou inguinales

TABEAU 1.1 : Les différents stades du cancer de l'endomètre adapté de Fuller, A.F. et al. "Atlas of Clinical Oncology, Uterine Cancer", 1^{ère} édition, BC Decker Inc., Hamilton : 230 (2004).

Pour ce qui est du grade du cancer, celui-ci fait référence au degré d'anomalie des cellules cancéreuses lorsqu'elles sont examinées au microscope et permet d'estimer la vitesse de propagation de la maladie. Il existe trois grades : le grade 1 démontre un cancer bien différencié et des cellules relativement normales qui croissent et se propagent adéquatement, le grade 2 est défini comme étant un cancer modérément différencié dont les cellules semblent anormales, tandis que le grade 3 est un cancer peu différencié ayant des cellules anormales qui croissent et se propagent très rapidement.

1.10.5 Les traitements

1.10.5.1 Généralités

Les femmes atteintes du cancer de l'endomètre peuvent avoir recours en tout premier lieu à la chirurgie, qui s'effectue également afin de déterminer le stade de la pathologie. Il s'agit en fait d'une hystérectomie combinée avec une salpingo-ovariectomie bilatérale régulièrement combinée avec la radiothérapie et s'avère le traitement de choix. Cependant, divers facteurs peuvent empêcher ce type de traitements, tels que l'âge de la femme, la présence de carcinome endométrial récurrent

ou de métastases et lors d'une réponse négative aux radiations. Face à cela, il a été démontré que quelques patientes ont répondu positivement à l'hormonothérapie, particulièrement lors de l'utilisation de progestérone (Lentz et al. 1996; Thigpen et al. 1999). Cependant, pour les femmes démontrant un cancer de l'endomètre de grade avancé, la chimiothérapie est le traitement de choix. Les taxanes, tel le taxol, les anthracyclines, dont la doxorubicine et le platine, tel le cisplatine, représentent les agents chimiothérapeutiques ayant la meilleure activité antinéoplasique lors d'un tel type de cancer (Pectasides et al. 2006). Le taux de réponse pour chacun de ces agents se situe entre 20% et 35% (Ball et al. 1996; Deppe et al. 1980; Lincoln et al. 2003; Lissoni et al. 1996; Thigpen et al. 1989).

1.10.5.2 Le cisplatine

Le cisplatine (*Cis*-diamminedichloroplatinum) est un agent antinéoplasique dérivé des composés platines. Une fois entrés dans la cellule, les ligands chlorures du cisplatine sont remplacés par des molécules d'eau générant ainsi une charge positive qui peut réagir avec les sites nucléophiles de l'ADN (Fig.1.16). À ce jour, les mécanismes qui confèrent au cisplatine son activité antinéoplasique ne sont pas complètement définis, mais il est généralement accepté qu'il agit en causant des dommages à l'ADN en se liant avec celui-ci, ce qui va conduire à la mort cellulaire par divers mécanismes, incluant l'induction de l'apoptose (Wang et Lippard 2005). Le cisplatine réagit avec deux sites différents de l'ADN, avec une préférence pour la position N-7 de la guanine et l'adénine, afin de produire des liens covalents. Ses liens peuvent être effectués sur un même brin d'ADN (>90%) ou sur les deux brins (<5%). En fait, ils peuvent survenir via trois modèles différents : liaison avec deux guanines constitutives présentes sur un même brin (65%), deux guanines présentes sur les deux brins différents (5-10%) ou une paire de guanine-adénine présente sur un même brin (25%) (Fig.1.17) (Kartalou et Essigmann 2001). Il en résulte donc une inhibition de la réplication de l'ADN (Ciccarelli et al. 1985; Salles et al. 1983; Uchida et al. 1986) et de la transcription de l'ARN (Mello et al. 1995), l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 et/ou la mort cellulaire programmée (Sorenson et al. 1990; Sorenson et Eastman 1988a; Sorenson et Eastman 1988b).

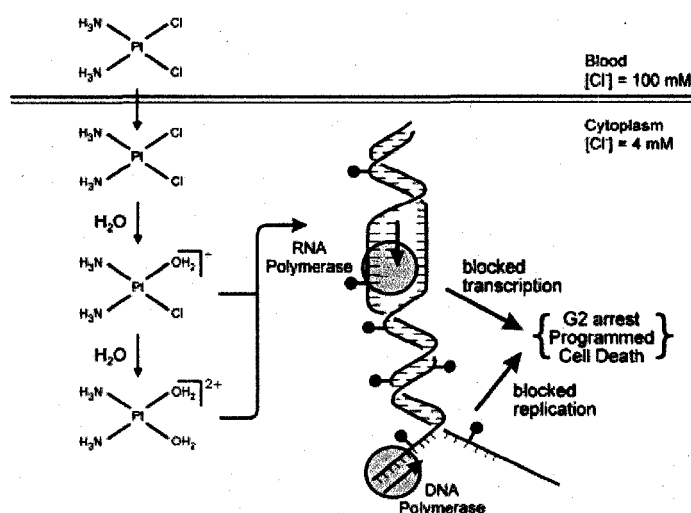


FIGURE 1.15 : Mécanisme d'action du cisplatine tirée de Kartalou, M. et al. "Mechanisms of resistance to cisplatin", Mutation Res. 478 : 23-43 (2001).

Le cisplatine est établie comme étant un agent anticancéreux important utilisé lors de cancers gynécologiques malins. De plus, il est reconnu pour être efficace contre les tumeurs solides, incluant celle du cancer du poumon et des ovaires où il démontre un bon taux de réponse. Il a également été reconnu pour être l'un des agents les plus actifs lors de cancers de l'endomètre avancés, démontrant un taux de réponse de 25% chez les femmes n'ayant reçu aucun traitement initial (Seski et al. 1982; Thigpen et al. 1989) et de 21% chez celles déjà traitées (Thigpen et al. 1984).

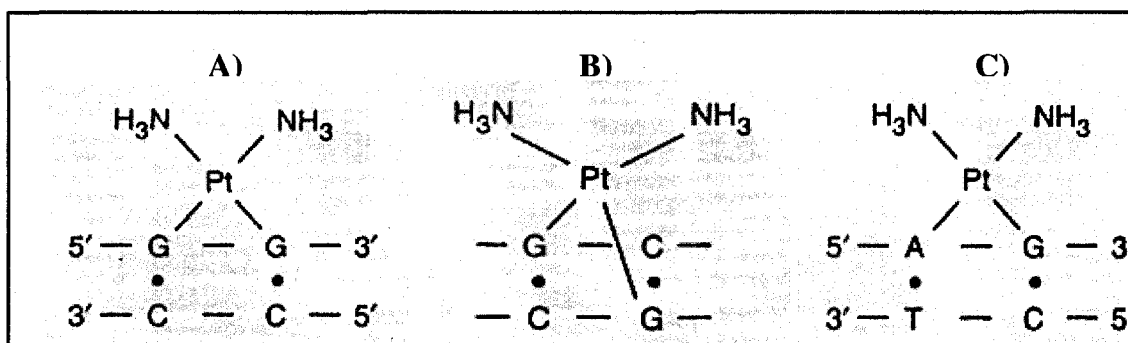


FIGURE 1.16 : Liaisons du cisplatine avec les différents acides nucléiques des brins d'ADN tirée de Chu, E. et al. "Cancer chemotherapy drug manual", 1^{ère} édition, Jones and Bartlett Publishers, Sudbury : 533 (2004).

Les cellules cancéreuses acquièrent souvent une résistance au cisplatine. Différents mécanismes peuvent être impliqués lors de cette résistance. La pompe d'exportation dépendante de l'ATP peut augmenter le taux d'exportation du cisplatine et peut être

impliquée dans la résistance à cette drogue en diminuant sa concentration intracellulaire (Chen et al. 1998; Ishikawa 1992; Ishikawa et Ali-Osman 1993). L'enzyme de synthèse métabolique du glutathione (GSS) peut également être impliquée dans la résistance au cisplatine, puisque la conjugaison de la drogue avec l'enzyme réduit le potentiel cytotoxique du cisplatine (Eastman 1987). De plus, la GSS peut protéger les cellules en maintenant la quantité de dNTP requise pour la réparation de l'ADN et la fonction des enzymes de réparation telle que la polymérase α (Lai et al. 1989). Ainsi, l'élévation de la GSS a été retrouvée chez plusieurs lignées cellulaires résistantes au cisplatine et une diminution de cette enzyme augmente la sensibilité des certaines lignées, tandis que d'autres demeurent résistantes (Chen et Zeller 1991; Godwin et al. 1992; Mistry et al. 1991; Mistry et al. 1993). Des altérations dans l'expression d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs ont également été reconnues pour être impliquées dans la résistance cellulaire au cisplatine. Cependant, l'effet de ces oncogènes ou de ces gènes suppresseurs de tumeur semble être spécifique à chaque type de cellule et ne prédit pas la réponse clinique des patientes à la suite d'un traitement au cisplatine.

La résistance au cisplatine est également associée avec une réduction de la réponse apoptotique. En effet, il a été démontré que les cellules du cancer de la peau ayant acquis le caractère de résistance au cisplatine *in vitro* démontrent une faible réponse apoptotique lorsque comparées aux cellules parentales (Zhao et al. 1995). Des altérations dans l'expression des régulateurs d'apoptose peuvent modifier la sensibilité des cellules à l'apoptose à la suite d'un traitement au cisplatine. Par exemple, les cellules qui expriment des hauts niveaux d'inhibiteurs d'apoptose ou de faibles niveaux de protéines promouvant l'apoptose requièrent d'avantage de dommages avant d'initier le procédé d'apoptose. Ainsi, une réduction de l'expression de Bax est observée chez les cellules du cancer de l'ovaire résistantes au cisplatine (Fajac et al. 1996; Perego et al. 1996; Sakakura et al. 1997) et, réciproquement, les cellules de carcinome squameux du cou et de la tête exprimant Bax sont plus sensibles au cisplatine à la fois en culture et chez l'animal (Sugimoto et al. 1999). De plus, des transfections avec Bcl-2 ou Bcl-xL confèrent la résistance au cisplatine (Eliopoulos et al. 1995; Gao et Dou 2000; Miyake et al. 1999) et une diminution de l'expression de Bcl-xL sensibilise les cellules à cette

drogue (Taylor et al. 1999). Enfin, la voie de signalisation des MAPK a également été reconnue pour être impliquée dans la résistance au cisplatine. Ainsi, il a été démontré que le cisplatine peut induire l'expression de la protéine MKP-1 (MAPK phosphatase-1), une phosphatase spécifique pour les trois types majeurs MAPK (Franklin et Kraft 1997; Li et al. 2001b; Noguchi et al. 1993; Sun et al. 1993). Cette induction de MKP-1 par le cisplatine s'effectue par un mécanisme transcriptionnel régulé par ERK. Ainsi, lorsque les cellules du cancer du poumon sont traitées avec le cisplatine, celle-ci induit une expression excessive de MKP-1, ce qui permet aux cellules d'acquérir une résistance pour cet agent chimiothérapeutique. Une diminution de MKP-1 chez ces mêmes cellules induit une sensibilité pour l'apoptose induite par le cisplatine (Wang et al. 2006).

1.10.5.3 La doxorubicine

La doxorubicine est une anthracycline chez laquelle les dommages à l'ADN sont considérés comme étant la première cause d'induction de mort cellulaire (Fig.1.18). En fait, la doxorubicine est considérée comme étant un inhibiteur de la topoisomérase II grâce à sa capacité de former un complexe avec celle-ci et l'ADN afin de créer une hélice compacte d'ADN torsadé, menant à une éventuelle cassure de l'ADN (Burden et Osheroff 1998). L'incapacité de réparer cette cassure va donc résulter en une réponse apoptotique. Cependant, le mécanisme par lequel la doxorubicine inhibe la topoisomérase II n'explique pas complètement le large spectre de toxicité que possède cette drogue (Gewirtz 1999). D'autres mécanismes d'action ont été suggérés comme étant ceux utilisés par la doxorubicine pour induire la mort cellulaire (Minotti et al. 2004), incluant l'inhibition de la synthèse d'ARN et d'ADN (Di Marco et al. 1965; Munger et al. 1988), la production de radicaux libres (Feinstein et al. 1993) et la formation de formaldéhyde permettant la formation des liens doxorubicine-ADN (Cutts et al. 2005a; Cutts et al. 2005b). De plus, le blocage de la transcription induit par cette drogue a été observé en position 5'-GpC-3' de l'ADN (Cullinane et Phillips 1990), indiquant que la doxorubicine forme un lien covalent avec l'ADN à cet endroit. Récemment, Swift et al. (2006) ont démontré que cette liaison est indépendante de la

réponse cellulaire classique induite par la topoisomérase II et induit d'avantage de toxicité (Swift et al. 2006). En fait, c'est la présence de formaldéhyde qui permet la liaison doxorubicine-ADN qui, par la suite, initie la cascade des caspases menant à l'apoptose. Cependant, celle-ci peut être bloquée par une augmentation de l'expression de Bcl-2 (Swift et al. 2006). De plus, de nombreuses études indiquent que la dose permettant à la doxorubicine d'induire l'apoptose varie dépendamment du type de cellules cancéreuses. En général, c'est à faible concentrations, moins de 5 μM , qu'elle induit l'apoptose (Emran et al. 2002; Ling et al. 1993; Skladanowski et Konopa 1993; Zaleskis et al. 1994).

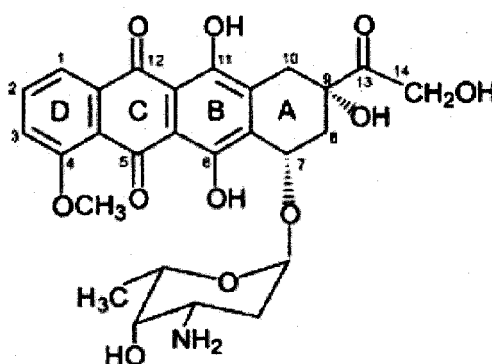


FIGURE 1.17 : Structure de la doxorubicine tirée de Minotti,G. et al. "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and carditoxicity", *Pharmacol. Rev.* 56: 185-229 (2004).

La doxorubicine, comme tous les agents de la classe des anthracyclines, est l'une des drogues les plus utilisées en chimiothérapie et démontre une activité étendue contre les tumeurs solides, les lymphomes et les leucémies (Swift et al. 2006). De plus, elle est couramment utilisée lors de cancer du sein, du poumon et des ovaires (Zhao et al. 2004) et démontre un taux de réponse de 22% et un taux de survie de 6,8 mois lors du traitement pour un cancer de l'endomètre (Thigpen et al. 2004). Afin d'augmenter le taux d'efficacité, les membres de cette famille sont couramment employés en combinaison avec des drogues d'autres groupes comme le cisplatine, ce qui permet de minimiser l'apparition du caractère résistant étant donné que chacune de ces drogues emploie un mécanisme d'action différent (Swift et al. 2006).

Une étude démontre que l'acquisition du phénotype de résistance à la doxorubicine est accompagnée d'une induction de l'expression de la glycoprotéine P (P-gp), une pompe ayant la capacité d'expulser les différentes drogues hors de la cellule (Mickley et al. 1989). De plus, il a été établi que les cellules devenues résistantes à la doxorubicine sécrètent dans leur environnement des facteurs permettant aux cellules sensibles de devenir résistantes à la doxorubicine, via la capacité d'augmenter leur niveau d'activation de la protéine Akt et l'inhibition de la caspase-3 (Emran et al. 2002). D'autres mécanismes sont également impliqués dans la résistance à la doxorubicine dont la diminution de l'expression de la topoisomérase II ou diverses mutations dans ce gène qui résultent en une diminution de l'affinité de la topoisomérase II pour la drogue. De plus, Huang et al. (2001) ont démontré qu'une diminution de l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN mène à une augmentation de l'expression de Bcl-2, ce qui contribue à la survie cellulaire, de même qu'à la résistance à la doxorubicine chez les cellules du cancer du poumon (Huang et al. 2001).

1.10.5.4 Le taxol (paclitaxel)

Le taxol (paclitaxel) est une drogue naturelle originaire de l'If du Pacifique, *Taxus Brevifolia* (Fig.1.19) (Wani et al. 1971). Il est maintenant établi que la faculté du taxol à induire la mort des cellules cancéreuses est générée grâce à sa capacité de se lier avec certaines protéines du cytosquelette. Ce dernier est un réseau constitué de plusieurs types de filaments protéiques qui s'étendent dans tout le cytosol, soient les microfilaments, les filaments intermédiaires et les microtubules. Leur organisation sert d'échafaudage qui contribue à donner à la cellule sa forme et à organiser son contenu. Dans notre cas, ce sont les microtubules qui attirent notre attention, puisque le taxol est reconnu pour s'y lier. Les microtubules sont de longs tubes rectilignes surtout composés de tubuline α et β et servent au transport intracellulaire des organites dont les vésicules de sécrétion. De plus, les microtubules ont la capacité de se grouper en triplets afin de former le fuseau de microtubules qui leur permettra de jouer un rôle important lors de la migration des chromosomes durant la division cellulaire (Tortora et Grabowski 2001).

Le taxol se lie préférentiellement à la sous-unité de tubuline β des microtubules (Rao et al. 1995), les stabilisant ainsi contre la dépolarisation et inhibant la réplication cellulaire en rompant la formation de fuseaux mitotiques normaux (Schiff et Horwitz 1980). *In vitro*, le taxol n'influence pas la polymérisation de l'actine et n'est pas reconnu pour se lier à l'ADN et aux filaments intermédiaires (Parness et Horwitz 1981). De plus, il n'affecte pas l'interaction des microtubules avec ses protéines associées dont le centrosome, aussi nommé centre organisateur des microtubules où débute l'assemblage des microtubules en un fuseau, et le kinétochore, région permettant l'attachement des chromatides sœurs aux fibres du fuseau de microtubules (De Brabander et al. 1981; Kumar 1981; Schiff et Horwitz 1981; Vallee 1982).

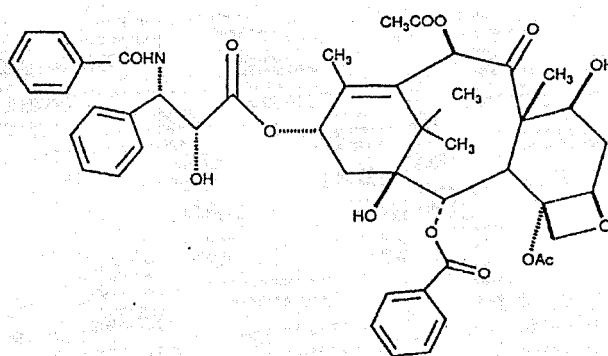


FIGURE 1.18 : Structure du taxol tirée de Rose, W.C. "Taxol : a review of its preclinical in vivo antitumor activity", *Anti-Cancer Drugs* 3: 311-321 (1992).

Il a été établi que différentes doses de taxol n'engendrent pas le même effet au niveau des microtubules et des procédés biochimiques cellulaires (Giannakakou et al. 2002; Jordan et al. 1993; Jordan et al. 1996; Torres et Horwitz 1998; Wang et al. 2000). De faibles concentrations de taxol altèrent la dynamique des microtubules et/ou induisent l'arrêt du cycle cellulaire en phase G_1 et G_2/M , tandis que de fortes concentrations (200 nm à 30 μM) causent des dommages importants aux microtubules (Wang et al. 2000). Il a également été démontré que le taxol peut directement affecter la mitochondrie via l'interaction avec les tubulines associées à la membrane mitochondriale (Carre et al. 2002) et qu'à de fortes concentrations, il peut se lier à Bcl-2, induisant ainsi une diminution du potentiel de la mitochondrie et par le fait même, l'apoptose (Ferlini et al. 2003). Une autre étude a démontré qu'une forte dose de taxol cause un relâchement

rapide de calcium hors de la mitochondrie et une perte du potentiel mitochondrial. Ainsi, chez les cellules de neuroblaste humain, 1 μ M de taxol induit le relâchement du cytochrome c de la mitochondrie, ce qui conduit les cellules à la mort cellulaire par apoptose (Andre et al. 2002). De plus, il a été démontré que le traitement des cellules cancéreuses avec le taxol induit l'apoptose *in vitro* et *in vivo* (Fan 1999) et que celui-ci peut altérer diverses cascades de signaux de transduction menant à l'expression des gènes et à la production de différentes cytokines (Bogdan et Ding 1992; Burkhart et al. 1994; Ding et al. 1990; Lee et al. 1997; Manthey et al. 1992; Manthey et al. 1993). Ainsi, il a été démontré qu'il active aussi des cascades de signaux impliquées dans l'apoptose ciblant des membres de la famille des Bcl-2, de même que JNK, Survivin, p21^{waf} et le TNF- α (tumor necrosis factor alpha) (Blagosklonny et al. 1996; Blagosklonny et al. 1997; Haldar et al. 1996; Ling et al. 2004; Torres et Horwitz 1998; Tudor et al. 2000).

Lors du traitement du cancer de l'endomètre, il a été démontré que le taxol est actif chez les patientes ayant des cancers avancés ou récurrents (Ball et al. 1996; Lissoni et al. 1996). De plus, des études utilisant des lignées du cancer de l'endomètre de grade I, II et III ont révélé que le taxol est efficace contre les adénocarcinomes de l'endomètre de grade II et III résistants aux composés platines (Hiramatsu et al. 2000). Le taxol est également un agent actif lors du traitement pour le cancer de l'endomètre chez les patientes ayant reçues antérieurement une chimiothérapie (Lincoln et al. 2003). Il est aussi couramment utilisé pour le traitement du cancer de l'ovaire et du sein et est reconnu pour être efficace contre le cancer du poumon, de la vessie et de l'œsophage (Chu et DeVita 2004). Cependant, le taux de réponse à cette drogue n'est pas supérieur à 27,3% indiquant ainsi 1) qu'il existe des cancers qui sont naturellement résistants au taxol chez lesquels les tumeurs sont définies comme ayant une résistance intrinsèque ou une insensibilité au taxol et 2) que le traitement avec le taxol mène au développement de la résistance où les cellules cancéreuses acquièrent cette résistance.

Les cellules cancéreuses peuvent acquérir la résistance au taxol par au moins deux mécanismes différents (Casazza et Fairchild 1996). Cette résistance est principalement

due à une variété de mécanismes incluant l'augmentation de l'expression de la glycoprotéine P (Horwitz et al. 1993). Cette résistance est en fait due à la fonction de la glycoprotéine P, soit d'être une pompe promouvant l'exportation du taxol hors de la cellule (Bhalla et al. 1994). Cependant, il a été démontré que l'expression de ce gène n'est pas le facteur majeur impliqué dans la résistance aux drogues présentes chez les carcinomes de l'endomètre (Kuo et al. 1996). Des altérations dans l'expression et la motilité des tubulines ont également été reportées chez les cellules résistantes au taxol (Cabral et Barlow 1989; Cabral et al. 1986; Kavallaris et al. 1997; Laferriere et Brown 1995; Ohta et al. 1994). Bien que les cibles directes du taxol, telles que les tubulines, soient responsables de la résistance à cet agent chimiothérapeutique, il a également été démontré que d'autres protéines impliquées dans la survie et la prolifération cellulaire, de même que dans l'angiogénèse sont reconnues pour jouer un rôle dans la résistance à cette drogue. Ainsi, les cellules du cancer du sein exprimant de façon excessive le récepteur ErbB-2/HER2, démontrent une résistance au taxol (Yu et al. 1996) et l'Herceptin, un anticorps monoclonal anti-ErbB-2/HER2, peut sensibiliser les cellules résistantes au taxol exprimant de grandes quantités de ErbB-2/HER2. De plus, il a été démontré que l'Herceptin combiné avec le taxol inhibe l'angiogénèse induite par ErbB-2/HER2 et que cet effet résulte en une diminution de P-Akt (Klos et al. 2003). L'expression abondante de Bcl-2 a également été reportée pour augmenter la résistance au taxol chez les cellules du cancer de la peau (Ferlini et al. 2003; Gazitt et al. 1998; Nuydens et al. 2000), tandis que chez les cellules du cancer de l'ovaire A2780, c'est une diminution de l'expression de Bcl-2 qui induit la résistance (Ferlini et al. 2003). Ces résultats démontrent bien que les mécanismes menant à la résistance aux drogues sont dépendants du type cellulaire.

1.10.5.5 Akt et la chimiorésistance

Bien qu'il ait été décrit dans les sections précédentes des mécanismes de résistance pour chacune des drogues à l'étude, de nombreuses recherches ont démontré une relation entre Akt et la résistance aux agents chimiothérapeutiques. Li et al. (2001) ont révélé que les cellules cancéreuses exprimant une forme constitutivement active de

Akt ou contenant une amplification excessive du gène de Akt sont plus résistantes au taxol que les cellules exprimant de faibles niveaux de ce gène (Li et al. 2001a). Il a également été démontré que l'inhibition de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt augmente le potentiel du taxol à induire l'apoptose chez les neurones corticaux (Figuerola-Masot et al. 2001), chez les cellules du cancer du poumon (NSCLC, «non-small cell lung carcinoma») (MacKeigan et al. 2002) de même que chez les cellules cancéreuses de l'œsophage (Nguyen et al. 2004). De plus, il a récemment été observé que les cellules du cancer de l'ovaire sensibles au cisplatine (A2780s et OV2008) transfectées avec un plasmide du gène Akt2 exprimé constitutivement deviennent résistantes au cisplatine (Dan et al. 2004). L'équipe de Yuan et al (2003) ont également prouvé que l'expression élevée d'un plasmide (Akt2 dominant-négatif (DN)) démontrant une mutation au site de phosphorylation de Akt2 et entrant en compétition avec le Akt2 endogène réduisant ainsi les niveaux de phosphorylation de Akt2, rend les cellules du cancer de l'ovaire résistantes au cisplatine (A2780cp et C13) susceptibles à l'apoptose induite par celle-ci (Yuan et al. 2003). Une étude antérieure rapporte également l'inhibition de la croissance tumorale et de l'invasion chez les lignées du cancer du pancréas transfectées avec un antisens d'ARNm du gène Akt2 (Cheng et al. 1996). L'activation excessive de Akt chez les cellules du cancer du sein résulte en la résistance à la doxorubicine et au taxol et une inhibition de la voie de PI 3-K/Akt avec le LY 294002 ou un plasmide contenant Akt-DN (Akt dominant-négatif) résulte en l'augmentation de l'apoptose induite par ces drogues (Clark et al. 2002; Jin et al. 2003; Knuefermann et al. 2003). Enfin, l'inhibition spécifique de l'isoforme Akt1 avec la technique de siRNA (small-interference RNA), qui permet la diminution des niveaux de la protéine grâce au fractionnement de l'ARNm, augmente la sensibilité des cellules du cancer du sein au taxol, mais n'a aucun effet sur l'apoptose induite par la doxorubicine (Liang et al. 2006). Ces résultats indiquent donc que l'activation de la voie de signalisation de Akt est associée avec la résistance aux drogues lors d'un cancer.

1.10.5.6 XIAP et la chimiorésistance

Différentes études ont également démontré que la protéine XIAP joue un rôle important lors de la résistance aux drogues. En effet, il a clairement été établi que lors de la résistance au cisplatine, XIAP joue un rôle important dans la sensibilité des cellules du cancer de l'ovaire en modulant le clivage de Akt par la caspase-3 (Asselin et al. 2001). Cette résistance peut être également expliquée par l'incapacité du cisplatine à diminuer les niveaux de XIAP et d'induire l'apoptose (Asselin et al. 2001; Li et al. 2000; Li et al. 2001a). Ce concept a également été observé chez les cellules du cancer de la bouche (Matsumiya et al. 2001). De plus, il a été démontré qu'une augmentation de l'expression de XIAP protège les cellules du cancer de la prostate contre l'apoptose induite par le taxol (Nomura et al. 2003). À ce jour, de nombreuses études ont démontré qu'une diminution de l'expression de XIAP induit l'apoptose chez les cellules du cancer de l'ovaire résistantes à la doxorubicine (Voelkel-Johnson et al. 2002) et sensibilise les cellules du cancer du poumon à de faibles doses d'irradiation γ (Holcik et al. 2000). Amantana et al. (2004) ont démontré qu'une combinaison de cisplatine avec un antisens d'ARNm du gène XIAP potentialise la sensibilité des cellules du cancer de la prostate à cette drogue (Amantana et al. 2004). L'utilisation d'un antisens d'ARNm du gène XIAP a également permis de constater que XIAP induit la résistance des cellules du cancer du sein au taxol (Lin et al. 2004). L'utilisation de la technique siRNA contre XIAP sensibilise les cellules du carcinome hépatocellulaire humain à la doxorubicine (Yamaguchi et al. 2005). Une étude *in vivo* utilisant les cellules du cancer du poumon a également démontré qu'une combinaison d'un antisens contre XIAP avec la vinorelbine, un agent anti-mitotique fonctionnant comme le taxol, retarde significativement l'établissement des xénogreffes (Hu et al. 2003). Enfin, Nomura et al. (2005) ont démontré que lorsque les cellules du cancer de la prostate acquièrent un phénotype de résistance au cisplatine, l'expression de cIAP-2, XIAP et Survivin augmente graduellement, ce qui démontre que les IAPs jouent un rôle important lors de la résistance à cette drogue chez ce type de cellules (Nomura et al. 2005). Ils ont également constaté que cette résistance au cisplatine est accompagnée de celle contre la doxorubicine, mais que les cellules ne démontrent aucune résistance contre le taxol.

1.11 Les objectifs

Le cancer de l'endomètre est le cancer gynécologique le plus important chez la femme. Cependant, lors d'un traitement avec la chimiothérapie, le taux de réponse aux drogues est souvent inférieur à 40%, ce qui indique que la résistance aux agents chimiothérapeutiques est présente chez la majorité des femmes souffrant d'un cancer. L'objectif de ce travail est donc de déterminer les mécanismes impliqués dans la résistance aux drogues, particulièrement le cisplatine, la doxorubicine et le taxol, lors d'un cancer de l'endomètre. Face aux résultats obtenus antérieurement par d'autres équipes de recherche, notre hypothèse de travail est que l'activation de la protéine Akt peut induire la régulation de certaines protéines inhibitrices d'apoptose et causer une chimiorésistance chez différentes lignées du cancer de l'utérus.

Plus spécifiquement, nos objectifs ont été :

- 1) De déterminer l'implication de la protéine Akt dans la régulation des protéines inhibitrices d'apoptose.
- 2) De déterminer l'implication possible de la protéine Akt lors de la résistance aux drogues et démontrer les différences pour chacun des isoformes.
- 3) De déterminer le rôle de la protéine XIAP lors de la résistance aux drogues.
- 4) De déterminer l'implication des phosphatases tyrosines et alcalines dans l'activation de Akt et déterminer leur rôle dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques.

Dans les sections suivantes, vous pourrez prendre connaissance des articles scientifiques qui se rapportent à cette étude dans les chapitre II, III, IV et V ainsi que la discussion, les perspectives futures et les conclusions générales de l'étude dans le chapitre VI.

CHAPTIRE II
AKT ACTIVITY IN ENDOMETRIAL CANCER CELLS: REGULATION OF
CELL SURVIVAL THROUGH CIAP-1

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre II (publié dans la revue *International Journal of Oncology*, 2003; 23 : 803-810) sont : Véronique Gagnon (fait les expériences, écriture de l'abstract, matériel et méthodes, figures), Marie-Eve St-Germain (participation aux expériences en relation avec la Wortmannin), Sophie Parent (mise au point des diverses expériences) et Eric Asselin, superviseur de la thèse (écriture et correction de l'article).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

Dans de nombreux cancers, incluant celui de l'endomètre, PTEN (tumor suppressor phosphatase tensin homologue), une phosphatase lipidique, est fréquemment mutée. PTEN déphosphoryle le produit du PI 3-K, le phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃), en un PIP₂ inactif, ce qui bloque l'activation/phosphorylation de Akt. Dans la présente étude, nous avons utilisé une lignée du cancer de l'endomètre connue pour avoir la protéine PTEN active (HEC-1-A) et deux lignées ayant la protéine PTEN mutée et inactive (RL-95-2 et Ishikawa) afin d'investiguer l'importance de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt lors d'un cancer de l'endomètre. Les résultats démontrent de hauts niveaux de l'ARNm et de la phosphorylation des protéines Akt1 et Akt2 chez les deux lignées du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN mutée. Afin de démontrer l'implication possible de Akt dans la régulation des facteurs de survie, l'expression des protéines Bcl-2, XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 a été mesurée. L'expression des protéines cIAP-1 et Bcl-2 est élevée chez les cellules exprimant phospho-Akt, tandis que celle de XIAP et cIAP-2 n'est pas influencée par la présence de la forme active de Akt. En présence d'un inhibiteur de PI 3-K (Wortmannin), la phosphorylation de Akt diminue et l'apoptose est fortement augmentée chez les lignées du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN mutée, ce qui est accompagné par une diminution de la régulation de la protéine cIAP-1. La Wortmannin n'engendre aucun effet chez la lignée HEC-1-A, reconnue pour posséder la protéine PTEN sauvage. Bien que la protéine Bcl-2 soit fortement exprimée chez les cellules ayant la protéine PTEN mutée, son expression demeure stable en présence de Wortmannin, suggérant que Bcl-2 n'est pas régulée par Akt. L'augmentation de l'expression de Akt en utilisant un vecteur d'expression contenant la protéine Akt exprimée de façon constitutive résulte en une augmentation de la régulation de cIAP-1. Ces résultats suggèrent que Akt joue un rôle clé dans la régulation des cellules du cancer de l'endomètre en augmentant la régulation d'une protéine inhibiteur d'apoptose : cIAP-1.

AKT ACTIVITY IN ENDOMETRIAL CANCER CELLS: REGULATION OF CELL SURVIVAL THROUGH cIAP-1[†]

Veronique Gagnon, Marie-Eve St-Germain, Sophie Parent and Eric Asselin*

Department of Chemistry and Biology, Medical Biology Section, University of Quebec
at Trois-Rivieres, C.P. 500, Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7

Running title: Akt regulates cIAP-1 in endometrial cancer

Key words: Akt, PTEN, Bcl-2, X-linked inhibitor of apoptosis protein, phosphatidylinositol 3-kinase, cIAPs, endometrial cancer.

* Corresponding Author: Eric Asselin, Ph.D.
Department of Chemistry and Biology
Medical Biology Section
University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500
Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7
E-mail: Eric_Asselin@uqtr.ca

[†] This work has been supported by a grant from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ). Eric Asselin is a FRSQ scholar.

ABSTRACT

In a number of different cancers including endometrial cancers, tumor suppressor phosphatase tensin homologue (PTEN, a lipid phosphatase) is frequently mutated. PTEN dephosphorylates a PI 3-K product, phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃), into inactive PIP₂, which blocks Akt activation/phosphorylation. In the present study, we have used one endometrial cancer cell line known to possess wild-type PTEN (HEC-1-A) and two mutated inactive PTEN protein cell lines (RL-95-2 and Ishikawa) to investigate importance of PI 3-K/PTEN/Akt survival pathway in endometrial cancers. As hypothesised, results showed high levels of Akt1/2 mRNAs and protein phosphorylation in the two mutated PTEN human endometrial cancer cells. To test the possible involvement of Akt in the regulation of survival factors, Bcl-2, XIAP, cIAP-1 and cIAP-2 expression were measured. cIAP-1 protein expression was high in cells expressing phospho-Akt. XIAP and cIAP-2 protein expression was not influenced by the presence of active Akt. Akt phosphorylation decreased and apoptosis was strongly increased in mutated PTEN human endometrial cancer cells in the presence of PI 3-K inhibitor (Wortmannin) which was accompanied by a down-regulation of cIAP-1 protein. Wortmannin had no effect on wild type PTEN HEC-1-A cell line. Although Bcl-2 expression was strongly expressed in mutated-PTEN cells, expression remained stable in the presence of Wortmannin suggesting that Bcl-2 is not regulated by Akt. Overexpression of Akt using a constitutively active Akt expression vector resulted in an up-regulation of cIAP-1 expression. These results suggest a pivotal role of Akt in the regulation of endometrial cancer cell survival through the up-regulation of a specific inhibitor of apoptosis protein.

INTRODUCTION

Phosphatase tensin homologue tumor-suppressor protein PTEN is one of the most commonly mutated tumor suppressor gene in human cancer. PTEN mutations have been found in several endometrial cancers (1-4). The human PTEN gene encodes a 403-amino acid polypeptide with lipid phosphatase activity. Most of tumor-associated PTEN mutations disrupt the integrity of its phosphatase domain (4,5). PTEN protein dephosphorylates position D3 of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) and generates inactive PIP₂ (6). PIP₃ is a direct product of PI 3-K and regulates PDK1, a kinase that phosphorylates and activates Akt. Thus, in a situation where wild type PTEN is present and/or up-regulated, PI 3-K/Akt survival pathway is blocked and apoptosis mechanisms may be activated. Adenovirus-mediated delivery of the wild type PTEN gene in known PTEN-mutated endometrial cancer cells has been shown to inhibit cell growth by induction of apoptosis (7). A study demonstrated that phosphorylation of Akt was accompanied by the loss of PTEN in clinical specimens of endometrial carcinomas (8).

Akt is a serine/threonine protein kinase originally discovered as the cellular counterpart of the v-Akt transforming protein of a retrovirus (AKT8) causing T cell lymphomas in mice (9) and is also known as protein kinase B or Rac (10-12). Akt is an inactive cytosolic protein recruited to the plasma membrane, and activated by phosphorylation at threonine 308 and serine 473 in response to growth factors or cytokines (13-15). The cell survival role of Akt has been demonstrated in multiple cell lineages (14,16). The molecule responsible for recruitment of Akt to the cellular membrane as well as activation of Akt is the lipid kinase PI 3-K. PI 3-K phosphorylates phosphoinositides (PtdIns) at position 3 of the inositol ring. More recently, PI 3-K has emerged as an important signaling molecule for diverse growth factor receptors in a variety of cell types (17). Upon activation, PI 3-K induces Akt phosphorylation which in turn 1) phosphorylates and blocks the action of several pro-apoptotic proteins such as Bad (14), and 2) blocks cytochrome C release from the mitochondria through the regulation of Bcl-2 (18). This is supported by the observation that an activated form of Akt is able to block apoptosis (19). To date, three isoforms of Akt

have been identified: Akt1, Akt2 and Akt3 (see (20) for a review). Akt isoforms are expressed and regulated differently in normal and cancer cells but their specific roles remain to be elucidated. The presence of active Akt in mutated PTEN human endometrial cancer cells Ishikawa and R1-95 was shown previously (21).

Recently we have shown in human ovarian surface epithelial (hOSE) cancer cells that X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP), member of a family of intracellular anti-apoptotic proteins, regulated Akt phosphorylation (22). XIAP belongs to a family of IAP genes which represents critical regulatory factors of apoptosis signaling and regulation. The IAP family also includes c-IAP1 (HIAP2), c-IAP2 (HIAP1), NAIP and Survivin (23). XIAP and c-IAPs are characterized by the presence of a caspase recruitment domain (CARD), an N-terminal baculovirus inhibitor of apoptosis repeat (BIR) motif and a C-terminal RING-Zinc finger domain, believed to be involved in protein-protein and protein-nucleic acid interactions. XIAP has been shown to be a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 (24) and to interfere with the Bax/cytochrome C pathway by inhibiting caspase-9 (25,26). Furthermore, down-regulation of XIAP with a vector expressing anti-sense XIAP cDNA has been shown to induce apoptosis in hOSE cancer cells (22,27). These reports suggest that XIAP may play a key role in the regulation of apoptosis in cancer cells.

In the present study, we have used three human endometrial cancer cell lines known to have wild type or mutated PTEN as an in vitro model to study the implication of Akt and to examine the possible involvement and interaction of Akt in the regulation of different inhibitor of apoptosis modulators. The results demonstrated that Akt activity induced cIAP-1 expression.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Wortmannin and Hoechst 33258 was obtained from Sigma (St. Louis, MO). DMEM-F12, Mc Coy's, FBS serum and PCR primers were purchased from Life Technologies (Burlington, ON). Anti-human PhosphoPlus Akt (Ser473), Akt, PTEN and XIAP antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON). c-IAP1 and

c-IAP2 antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and Bcl-2 from Mediacorp (Montréal, QC).

Cell culture. Human endometrial cancer cells (HEC-1-A, RL-95-2) were obtained from ATCC. Ishikawa cells were generously provided by Dr Sylvie Mader, Université de Montréal (QC, Canada) and HeLa cells generously provided by Dr Michel Vincent, Université Laval (QC, Canada). Cells were cultured in 75 cm² bottles at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. Ishikawa and HeLa cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with 2.438 g/L of NaHCO₃, FBS (10%) and gentamycin (50 µg/mL). HEC-1-A cells were grown in Mc Coy's supplemented with 2.2 g/L of NaHCO₃, FBS (10%) and gentamycin (50 µg/mL). RL-95-2 were cultured in DMEM-F12 supplemented with 1.75 g/L of NaHCO₃, HEPES (5 µM), insulin (2.5 µg/mL), FBS (10%) and gentamycin (50 µg/mL). 1x10⁶ cells were plated in log growth phase in the above culture medium prior to initiation of treatment.

Wortmannin treatments. HEC-1-A, RL-95-2 and Ishikawa cells were plated in 75 cm² bottles (1x10⁶ cells/well) 24 hours before treatments. Cells were treated for 24 hours with Wortmannin 50 µM. The Wortmannin dose and treatment time were chosen following time-courses and dose-responses preliminary studies.

Protein extraction and Western analysis. Cells were trypsinized, lysed in lysis buffer ((pH 7.4); 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, protease inhibitor PMSF (1mM) and 1 mM Na orthovanadate), frozen and thaw three times, and centrifuged (13000 X g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated (95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electro-transferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semi-dry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked (2 hrs, RT) with PBS containing 5% milk powder, then incubated with anti-PTEN (1:500), anti-XIAP (1:500), anti-cIAP-1 (1:500), anti-cIAP-2 (1:750), anti-Akt (1:1000) or anti-Phospho-PKB/Akt (1:250) antibody

(overnight, 4°C), and subsequently with Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3000; RT, 45 min). Peroxidase activity was visualized with the ECL plus kit (Amersham, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time RT-PCR analysis. In order to measure abundance of Akt1, Akt2, Akt3, and PTEN mRNAs, primers were chosen as described below and tested with different primer concentrations. Total RNA (0,2 µg/µl) was used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated (65°C, 10 min) with 2:1 oligo (deoxythymidine) primers in a final volume of 10:1. Samples were then incubated (37°C, 60 min) in 20:1 of a reaction buffer (1X) containing dithiothreitol (DTT; 100 mM), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; 5 mM) and Muloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; 200 U). The reaction volumes were brought up to 60:1 with autoclaved water. A negative control was also included, using the same reaction mixture but without MMLV-RT to ensure absence of any contaminating genomic DNA in the RNA template.

Human Akt1 mRNA [159-1628 bp;(28)] was amplified using sense primer 5'-TGAGAGGAGCGCGTGAGC-3' and antisense primer 5'-TGGCCGAGTAGGAGA ACTG -3'. For Akt2 mRNA, the expression was determined by amplification of 1450 bp [196-1636 bp;(28)] and the sequence of the primers were 5'-GCCACCATGAATGAGGTGT-3' (sense) and 5'-TGGCCGAGTAGGAGAACTG-3' (antisense). Expression of Akt3 was determined by amplification of a 1547-bp [503-1152 bp,(29)]. Amplification was carried out using the antisense downstream sequence 5'-AAGAGCCCTGAAAGCAATGA-3' and the sense upstream sequence 5'-GTTCGAGAGAAGGCAAGTGG-3'. Human PTEN mRNA [1025-1748 bp; GenBank accession number XM_005867] was amplified using sense primer 5'-CCAGACATGACAGCCATC-3' and antisense primer 5'-GAACTTGTCTTCCCGTCG-3'. Human β-actin mRNA was amplified using sense primer 5'-GAGGATCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGGTC-3' and antisense primer 5'-CAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCA-3'. Each reaction mixture (final

volume 20:1) contain RT template or negative control (2:1), MgCl_2 (3 mM), primers (0,3 μM) and LC DNA FastSTART DNA Master SYBR Green 1 (2 μl) (Roche). Each PCR reaction was inserted in a LightCycler capillary. The PCR cycling conditions chosen were (1) 10 sec at 95°C, (2) 5 sec at 70°C (Akt1); 67°C (Akt2 and PTEN); 59°C (Akt3), and (3) 59 sec (Akt1); 58 sec (Akt2); 26 sec (Akt3 and PTEN) at 72°C. A melting curve was generated for each reaction and the conditions were (1) 95°C, (2) 30 sec at the annealing temperature, and (3) temperature up to 95°C (0.2°C/sec). Finally, the DNA concentration of each reaction was determined quantitatively using a standard curve. β -actin was used as the control reaction. Reaction products were analysed on 1.0% agarose gels. Bands were visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments were cloned and sequenced to confirm the corresponding sequence.

Transfections. Hela cells were plated at a density of 2×10^5 cells/well in six-well plates 24 hours before transfection. Transient transfection of the cells was carried out with 1 μg of constitutively active (CA) Akt expression vector/well using Superfect reagent (Qiagen), according to the protocol suggested by the manufacturer. Empty vector was used as the transfection control. Transfection efficiencies were determined by Western analysis using an anti-Akt and anti-Phospho-Akt antibodies.

Hoechst staining. Following treatment, both floating and attached cells were resuspended in PBS containing Hoechst 33258 for 24 hours at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using a Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON). Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted, using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the “counter” was not aware of the treatment, so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group were counted in each experiment.

Statistical analysis. All experiments were repeated a minimum of six times. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA)

or student t test. Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Expression of mRNA genes. To determine basal levels of Akt1, Akt2, Akt3, and PTEN mRNAs, quantitative real-time RT-PCR studies have been carried out using specific primers chosen from human DNA sequences with the aid of the real-time PCR LightCycler (Roche). The presence of Akt1 was observed predominantly in mutated-PTEN human endometrial cancer cells (Fig. 1). Akt2 mRNA was present in all cell lines. However, Akt3 was nearly undetectable in both mutated and wt-PTEN human endometrial cancer cells. PTEN mRNA was present in HEC-1-A, RL-95-2 and Ishikawa cells and no significant difference was detected.

Protein expression and Akt phosphorylation. Western blot analyses revealed and confirmed that PTEN was expressed predominantly in wild type PTEN HEC-1-A cell line (Fig. 2). Akt protein expression was not significantly different in mutated versus wild-type PTEN cells. However, Akt phosphorylation was absent in HEC-1-A cell line whereas Akt phosphorylation levels were strong in mutated PTEN human endometrial cancer cells RL-95-2 and Ishikawa. In order to determine if Akt3 protein was present, a positive control containing all three Akt1, Akt2 and Akt3 proteins was added. A previous report clearly identified the faster Akt migrating band as Akt3 (30). Since Akt and phospho-Akt antibodies used recognize all three isoforms, real-time RT-PCR studies (Fig. 1) support the hypothesis that Akt3 is not present in these cell lines and that Akt1 and Akt2 are the regulated isoforms.

Inhibitor of apoptosis protein expression. In order to determine the basal expression of inhibitor of apoptosis proteins in mutated versus wild-type PTEN cells, Western analyses were performed using total proteins from each human endometrial cancer cell lines (Fig. 3). Levels of Bcl-2 protein were high in both mutated PTEN cells and absent in HEC-1-A wild-type PTEN cell line. Expression of XIAP protein was observed in all three cell lines

studied but its expression was not significantly different. Expression of cIAP-1 was significantly higher in mutated-PTEN cells expressing phospho-Akt (RL-95-2 and Ishikawa). cIAP-2 was present in all cell lines without significant difference in term of abundance.

PI 3-K inhibition experiments. To test the importance of PI 3-K in the activation of Akt and cell survival, phospho-Akt expressing cells (RL 95-2 and Ishikawa) and phospho-Akt negative cells (HEC-1-A; used as a control) were cultured in the presence of Wortmannin for 24 hours (Fig. 4-6). PI 3-K inhibitor significantly reduced Akt phosphorylation in both RL-95-2 and Ishikawa cell and significantly inhibited cIAP-1 protein expression. Furthermore, treatment of mutated PTEN cells with Wortmannin induced apoptosis as demonstrated by the Hoechst nuclear staining assay (Fig. 5 and 6). To confirm that Wortmannin induces apoptosis in RL-95-2 and Ishikawa cells, Western analyses were performed using a specific cleaved caspase-3 antibody. Caspase-3 cleaved fragment was absent under untreated conditions and present only in the presence of Wortmannin supporting the results obtained with the Hoechst analysis. PI 3-K inhibitor failed to induce apoptosis in HEC-1-A cells as demonstrated by the absence of a cleaved capase-3 fragment and the absence of apoptotic cells (Hoechst analysis) (Fig. 4). Wortmannin had no effect on cIAP-1 expression in HEC-1-A cell line. As opposed to cIAP-1 expression, treatment of mutated PTEN cells with Wortmannin showed no effect on Bcl-2 protein expression. Interestingly, total Akt protein was down-regulated in RL-95-2 cells in the presence of Wortmannin indicating that Akt may be a possible substrate for caspase-3 cleavage as demonstrated previously in other human cancer cell line (22).

Constitutively active Akt transfection induced cIAP-1 protein expression. Because we failed to efficiently transfect HEC-1-A, RL-95-2 and Ishikawa endometrial cancer cell lines to perform a “gain-of-function” experiment, we used the well known and characterized HeLa cell line in order to further confirm the link between Akt and cIAP-1 expression (Fig. 7). The results clearly demonstrate that transfection of HeLa cells with a constitutively active (CA) Akt expression vector induces cIAP-1 protein expression. Transfection

efficiency was correlated with an increase of both total Akt protein and Akt phosphorylation status.

DISCUSSION

The present report proposes an interesting model to study the involvement and importance of PTEN in endometrial cancer. PTEN is one of the most mutated protein in endometrial carcinomas. Such model will be very useful to investigate the relationship between PTEN and other signaling pathways and molecules, particularly through the PI 3-K/Akt survival pathway. Results of the present study clearly demonstrate that high levels of Akt phosphorylation is observed in mutated-PTEN human endometrial cancer cells indicating that downstream Akt survival pathway is constitutively activated in the absence of a functional PTEN protein and confirmed results obtained by others (21). The simple treatment of mutated-PTEN human endometrial cancer cells with PI 3-K inhibitor triggers apoptotic process which indicates that the regulation of the PI 3-K/Akt survival pathway is crucial in determining the fate of cancerous endometrial cells. Because wild-type PTEN HEC-1-A cell line was not sensitive to PI 3-K inhibitor whereas apoptosis was induced in mutated PTEN cells, it is suggested that PI 3-K may be a good target for gene therapy of endometrial cancer cell expressing phospho-Akt.

Although the physiological role of XIAP is not fully understood, it is considered an important intracellular anti-apoptotic factor and is known to suppress cell death by binding to and inhibiting caspase-3, caspase-7 (24), and caspase-9 (25). In this regard, a decrease and/or degradation of XIAP protein would induce apoptotic processes, at least in part through activation of pro-caspases. Recently, we have demonstrated that over-expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) in human ovarian surface epithelial cancer cells and in rat granulosa cells induced phosphorylation of Akt (22,31). A similar process may be responsible for this independent activation of Akt. To determine if XIAP may be involved in this process, the level of XIAP protein was measured by Western analysis in the different human endometrial cancer cell lines. The results showed that expression of XIAP protein was not influenced by the presence of active Akt protein in human endometrial cancer cells. As opposed to the previous study using human ovarian surface

epithelial cancer cells, the regulation of the PI 3-K/Akt survival pathway through XIAP may not be involved in endometrial cancer.

Akt has been shown to phosphorylate Bad resulting in release of Bcl-2 and inhibition of the apoptotic process (see (32)). Results of the present study showed that levels of Bcl-2 protein were maximal in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. It was then hypothesized that activation of Akt may in turn be involved in the regulation of the inhibitor of apoptosis Bcl-2 gene expression and protein synthesis. Recent studies have demonstrated a similar up-regulation of Bcl-2 expression in the presence of active Akt (33,34). cAMP-response element-binding protein (CREB) may be the possible target for Akt to induce Bcl-2 gene expression (34). However, inhibition of PI 3-K and Akt phosphorylation failed to decrease Bcl-2 expression in the two mutated-PTEN human endometrial cancer cell lines. It is possible that Bcl-2 expression in the two mutated-PTEN cell lines may be regulated through other signaling pathway interacting downstream of Akt or in cooperativity with Akt. The precise importance of Akt versus Bcl-2 regulation involving other signaling pathways is currently under investigation.

Although, PI 3-K inhibitor failed to down-regulate Bcl-2 gene expression, Wortmannin successfully decreased cIAP-1 protein expression in both mutated PTEN cell lines expressing phospho-Akt and cIAP-1. cIAP-1 is a member of an evolutionarily conserved family of homologous proteins that inhibit apoptosis induced by various stimuli. cIAP-1 can bind and directly inhibit selected caspases, a group of intracellular cell death proteases (24). The present results clearly demonstrate that caspase-3 is activated when apoptosis is induced by Wortmannin in mutated-PTEN cells. Activation of caspase-3 may be explained by the down-regulation of cIAP-1 during this process. A recent study showed that activation of Akt may lead to activation of cIAP-1 gene expression through the activation of raf/erk and p65 NF- κ B indicating that a similar process may be involved in these phospho-Akt expressing endometrial cancer cells (35). Since Akt phosphorylation has been shown to activate NF- κ B (36), activation of cIAP-1 gene and protein expression is likely to be through this signaling pathway in phospho-Akt expressing RL 95-2 and Ishikawa human endometrial cancer cell lines used in the

present study. The present investigation demonstrates that the three inhibitors of apoptosis studied (Bcl-2, c-IAP1 and XIAP) may be key elements to our understanding of cell survival induced downstream of the PI 3-K/Akt signaling pathway but their specific regulation may involve other signal transduction molecules yet to be identified.

Real-time quantitative RT-PCR studies revealed that the regulation of Akt1 and Akt2 was not different in wild-type PTEN cells compared to mutated-PTEN cell lines whereas Akt3 mRNA and protein were absent. Recent studies showed an over-expression of Akt2 in human ovarian surface epithelial cell (37,38), breast cancer (16,38), and pancreatic cancers (39). Whether specifically Akt1 and/or Akt2 are involved in the regulation of cIAP-1 protein expression remained to be elucidated. A recent study demonstrated that Akt1 and Akt2 binds to all members of the proto-oncogene TCL1 family (40). These newly identified proto-oncogenes may be potential candidates in the control of Akt intra-cellular signalization. Given that in several systems Akt1 and Akt2 may exert opposite effects (41), the specific function of these two Akt isoforms will require deeper investigations.

In conclusion, the present study demonstrates that the PI 3-K/Akt pathway is highly activated in mutated-PTEN endometrial cancer cells compared to wt-PTEN endometrial cancer cells and that inhibition of this pathway directly induces cell death through inhibition of cIAP-1 expression and activation of caspase-3. This study is the first to demonstrate a link between Akt signalization and cIAP-1 expression. Further studies will be necessary to determine the precise molecular mechanism by which Akt regulates cIAP-1 expression in cancer endometrial cells.

REFERENCES

1. Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A and Barrett JC: PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res.* 57: 4736-4738, 1997.
2. Risinger JI, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC and Berchuck A: PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin. Cancer Res.* 4: 3005-3010, 1998.
3. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R and Ellenson LH: Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.* 57: 3935-3940, 1997.
4. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP, Hughes KS, Eeles RA, Hodgson SV, Murday VA, Houlston R and Eng C: Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J. Med. Genet.* 35: 881-885, 1998.
5. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD and Bigner SH: PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res.* 57: 4187-4190, 1997.
6. Maehama T, Dixon JE: The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 13375-13378, 1998.
7. Sakurada A, Hamada H, Fukushige S, Yokoyama T, Yoshinaga K, Furukawa T, Sato S, Yajima A, Sato M, Fujimura S and Horii A: Adenovirus-mediated delivery of the PTEN gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer. *Int. J. Oncol.* 15: 1069-1074, 1999.
8. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R and Terakawa N: Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 7: 892-895, 2001.
9. Staal SP: Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues Akt1 and Akt2: amplification of Akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 5034-5037, 1987.
10. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP and Tsichlis PN: A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 254: 274-277, 1991.
11. Coffey PJ, Woodgett JR: Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur J Biochem* 201: 475-481, 1991.

12. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F and Hemmings BA: Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 4171-4175, 1991.
13. Stephens L, Anderson K, Stokoe D, Erdjument-Bromage H, Painter GF, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, McCormick F, Tempst P, Coadwell J and Hawkins PT: Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B. *Science* 279: 710-714, 1998.
14. Hayakawa J, Ohmichi M, Kurachi H, Kanda Y, Hisamoto K, Nishio Y, Adachi K, Tasaka K, Kanzaki T and Murata Y: Inhibition of BAD phosphorylation either at serine 112 via extracellular signal-regulated protein kinase cascade or at serine 136 via Akt cascade sensitizes human ovarian cancer cells to cisplatin. *Cancer Res.* 60: 5988-5994, 2000.
15. Suzuki Y, Nakabayashi Y and Takahashi R: Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 8662-8667, 2001.
16. Sun M, Paciga JE, Feldman RI, Yuan Z, Coppola D, Lu YY, Shelley SA, Nicosia SV and Cheng JQ: Phosphatidylinositol-3-OH Kinase (PI3K)/Akt2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K. *Cancer Res.* 61: 5985-5991, 2001.
17. Panayotou G, Waterfield MD: The assembly of signalling complexes by receptor tyrosine kinases. *Bioessays* 15: 171-177, 1993.
18. Davies MA, Koul D, Dhesi H, Berman R, McDonnell TJ, McConkey D, Yung WK and Steck PA: Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN. *Cancer Res.* 59: 2551-2556, 1999.
19. Kennedy SG, Wagner AJ, Conzen SD, Jordan J, Bellacosa A, Tsichlis PN and Hay N: The PI 3-kinase/Akt signaling pathway delivers an anti-apoptotic signal. *Genes Dev.* 11: 701-713, 1997.
20. Nicholson KM, Anderson NG: The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 14: 381-395, 2002.
21. Lilja JF, Wu D, Reynolds RK and Lin J: Growth suppression activity of the PTEN tumor suppressor gene in human endometrial cancer cells. *Anticancer Res.* 21: 1969-1974, 2001.
22. Asselin E, Mills GB and Tsang BK: XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 61: 1862-1868, 2001.

23. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG and Mackenzie AE: The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer. *Oncogene* 17: 3247-3259, 1998.
24. Takahashi R, Deveraux Q, Tamm I, Welsh K, Assa-Munt N, Salvesen GS and Reed JC: A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J. Biol. Chem.* 273: 7787-7790, 1998.
25. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS and Reed JC: X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 388: 300-304, 1997.
26. Schmedtje JF, Jr., Ji YS, Liu WL, DuBois RN and Runge MS: Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF-kappaB p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272: 601-608, 1997.
27. Sasaki H, Sheng Y, Kotsuji F and Tsang BK: Down-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis protein induces apoptosis in chemoresistant human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 60: 5659-5666, 2000.
28. Staal SP: Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues Akt1 and Akt2: amplification of kt1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84: 5034-5037, 1987.
29. Masure S, Haefner B, Wesselink JJ, Hoefnagel E, Mortier E, Verhasselt P, Tuytelaars A, Gordon R and Richardson A: Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *Eur. J. Biochem.* 265: 353-360, 1999.
30. Okano J, Gaslightwala I, Birnbaum MJ, Rustgi AK and Nakagawa H: Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.* 275: 30934-30942, 2000.
31. Asselin E, Wang Y and Tsang BK: X-linked inhibitor of apoptosis protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in rat granulosa cells during follicular development. *Endocrinology* 142: 2451-2457, 2001.
32. Datta SR, Brunet A and Greenberg ME: Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13: 2905-2927, 1999.
33. Flusberg DA, Numaguchi Y and Ingber DE: Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells. *Mol. Biol. Cell.* 12: 3087-3094, 2001.
34. Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE and Reusch JE: Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* 275: 10761-10766, 2000.

35. Gelfanov VM, Burgess GS, Litz-Jackson S, King AJ, Marshall MS, Nakshatri H and Boswell HS: Transformation of interleukin-3-dependent cells without participation of Stat5/bcl-xL: cooperation of akt with raf/erk leads to p65 nuclear factor kappaB-mediated antiapoptosis involving c-IAP2. *Blood* 98: 2508-2517, 2001.
36. Kane LP, Shapiro VS, Stokoe D and Weiss A: Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase. *Curr. Biol.* 9: 601-604, 1999.
37. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN and Testa JR: Akt2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89: 9267-9271, 1992.
38. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G, Masciullo V: Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int. J. Cancer* 64: 280-285, 1995.
39. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK and Testa JR: Amplification of Akt2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 3636-3641, 1996.
40. Laine J, Kunstle G, Obata T and Noguchi M: Differential regulation of Akt kinase isoforms by the members of the TCL1 oncogene family. *J. Biol. Chem.* 277: 3743-3751, 2002.
41. Sumitani S, Goya K, Testa JR, Kouhara H and Kasayama S: Akt1 and Akt2 differently regulate muscle creatine kinase and myogenin gene transcription in insulin-induced differentiation of C2C12 myoblasts. *Endocrinology* 143: 820-828, 2002.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1** Akt-1, Akt-2, Akt3 and PTEN mRNA abundance in wild-type PTEN cell (HEC-1-A) and mutated PTEN cells (RL-95-2, Ishikawa) as determined by quantitative real-time RT-PCR. β -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using the LightCycler and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent mean \pm SEM of 6 independent experiments. A positive control was added to each PCR reaction. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
- Figure 2** Akt, Phospho-Akt and PTEN protein abundance in wild-type PTEN cell (HEC-1-A) and mutated PTEN cells (RL-95-2, Ishikawa) as determined by Western analyses. β -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent mean \pm SEM of 6 independent experiments. A positive control containing all three Akt isoforms was included. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
- Figure 3** Levels of cIAPs, XIAP and Bcl-2 proteins in human endometrial cancer cells as determined by Western analyses. β -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using BIO RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent mean \pm SEM of 6 independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
- Figure 4** Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in HEC-1-A cells. 1×10^6 cells were plated for 24 h and cultured for another 24 h in culture medium containing Wortmannin (50 μ M). Cells were trypsinized, pooled (attached and floating) and collected for Hoechst nuclear staining to count nuclear fragmentation and

apoptotic cells. Western analysis was performed on total protein content for (A) Akt, (B) specific cleaved caspase-3, and (C) cIAP-1. D) Representative micrograph of Hoechst staining and % of apoptosis in the presence of treatment. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

Figure 5 Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in RL-95-2 cells. 1×10^6 cells were plated for 24 h and cultured for another 24 h in culture medium containing Wortmannin (50 μ M). Cells were trypsinized, pooled (attached and floating) and collected for Hoechst nuclear staining to count nuclear fragmentation and apoptotic cells. Western analysis was performed on total protein content for (A) Akt, (B) phospho-Akt, (C) cIAP-1, (D) Bcl-2, and (E) specific cleaved caspase-3. F) Representative micrograph of Hoechst staining and % of apoptosis in the presence of treatment. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 6 Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in Ishikawa cells. 1×10^6 cells were plated for 24 h and cultured for another 24 h in culture medium containing Wortmannin (50 μ M). Cells were trypsinized, pooled (attached and floating) and collected for Hoechst nuclear staining to count nuclear fragmentation and apoptotic cells. Western analysis was performed on total protein content for (A) Akt, (B) phospho-Akt, (C) cIAP-1, (D) Bcl-2, and (E) specific cleaved caspase-3. F) Representative micrograph of Hoechst staining and % of apoptosis in the presence of treatment. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

Figure 7 Effect of constitutively active Akt on cIAP-1 protein expression. HeLa cells were transfected with Akt constitutively active (CA) vector or control vector and Akt protein, phospho-Akt and cIAP-1 protein levels were measured by Western analyses. Data represent the mean \pm SEM of 4

independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

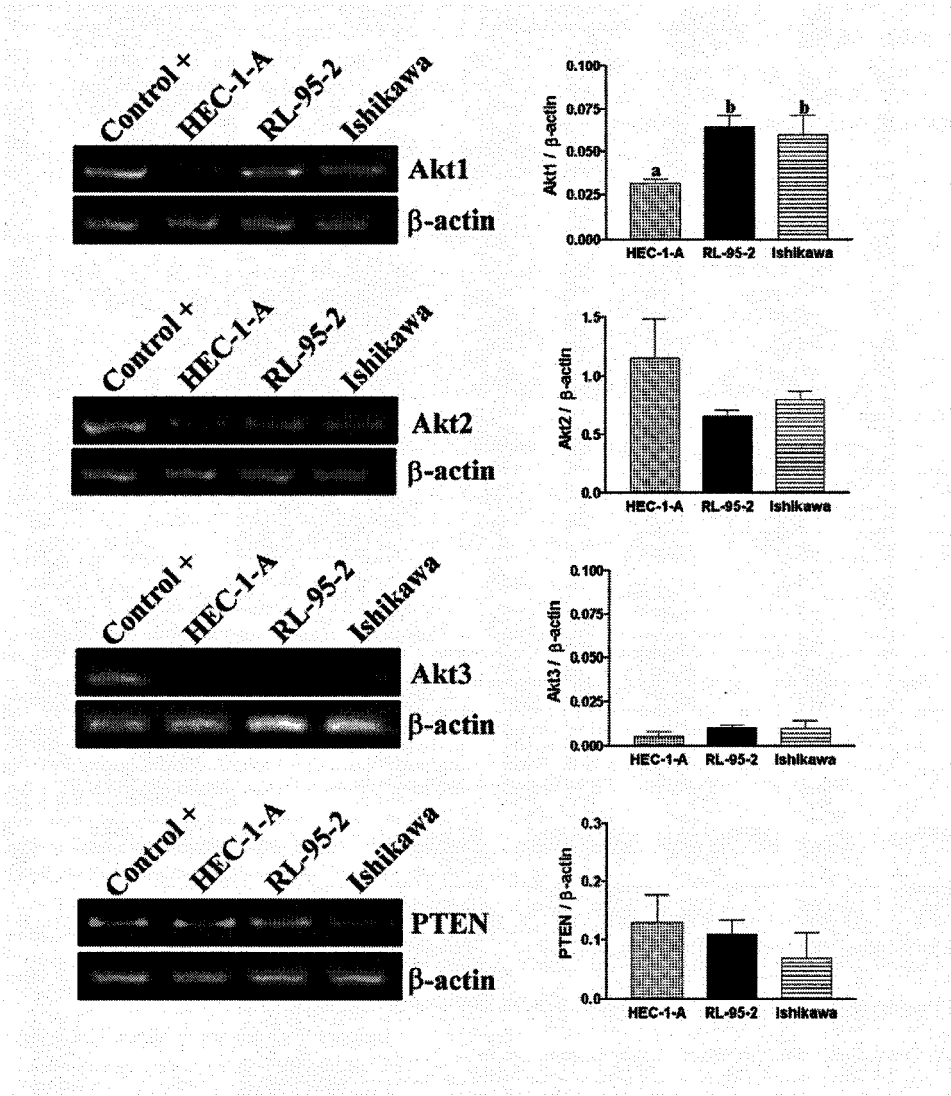


FIGURE 1 Expression of mRNA genes

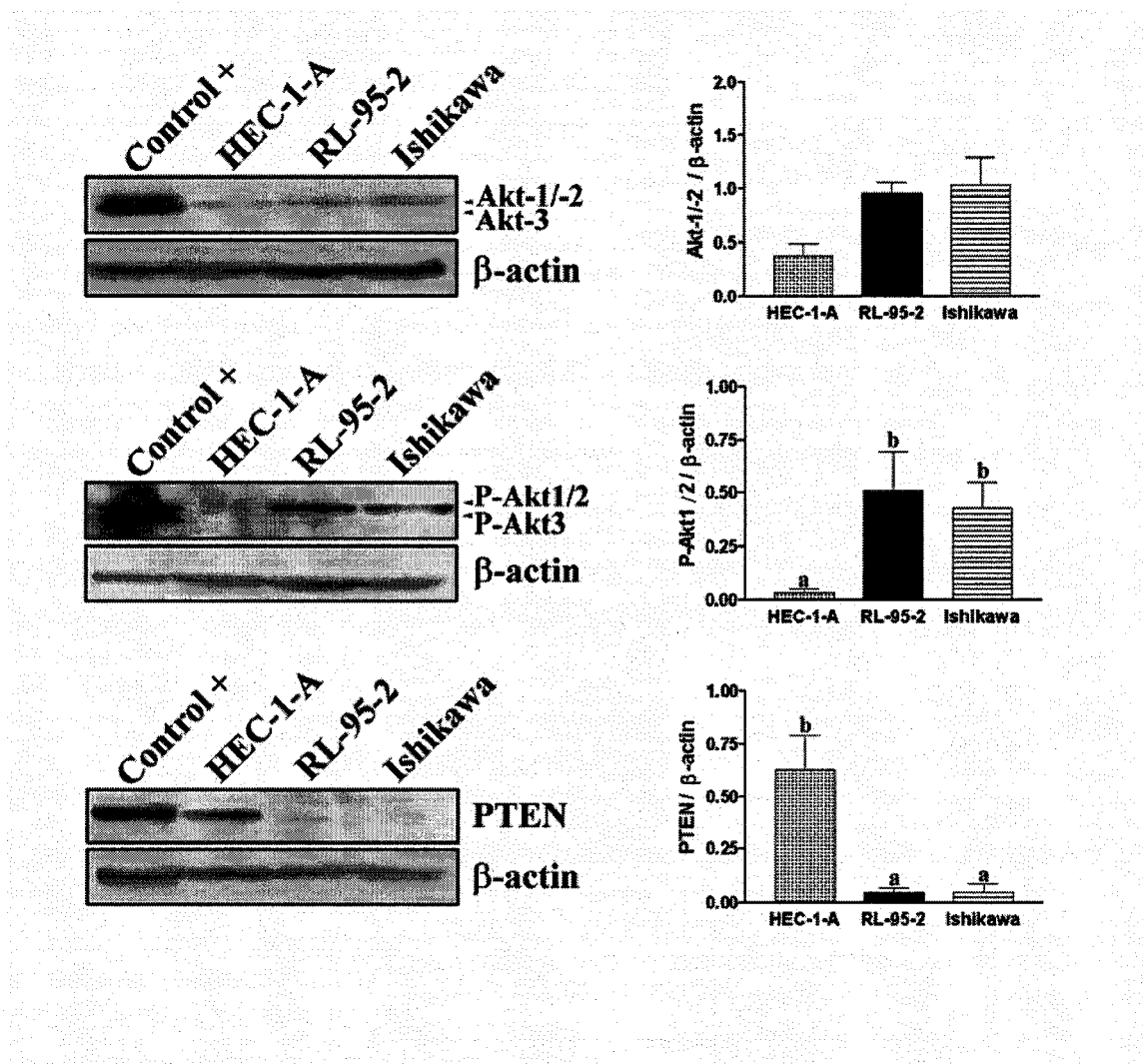


FIGURE 2 Protein expression and Akt phosphorylation

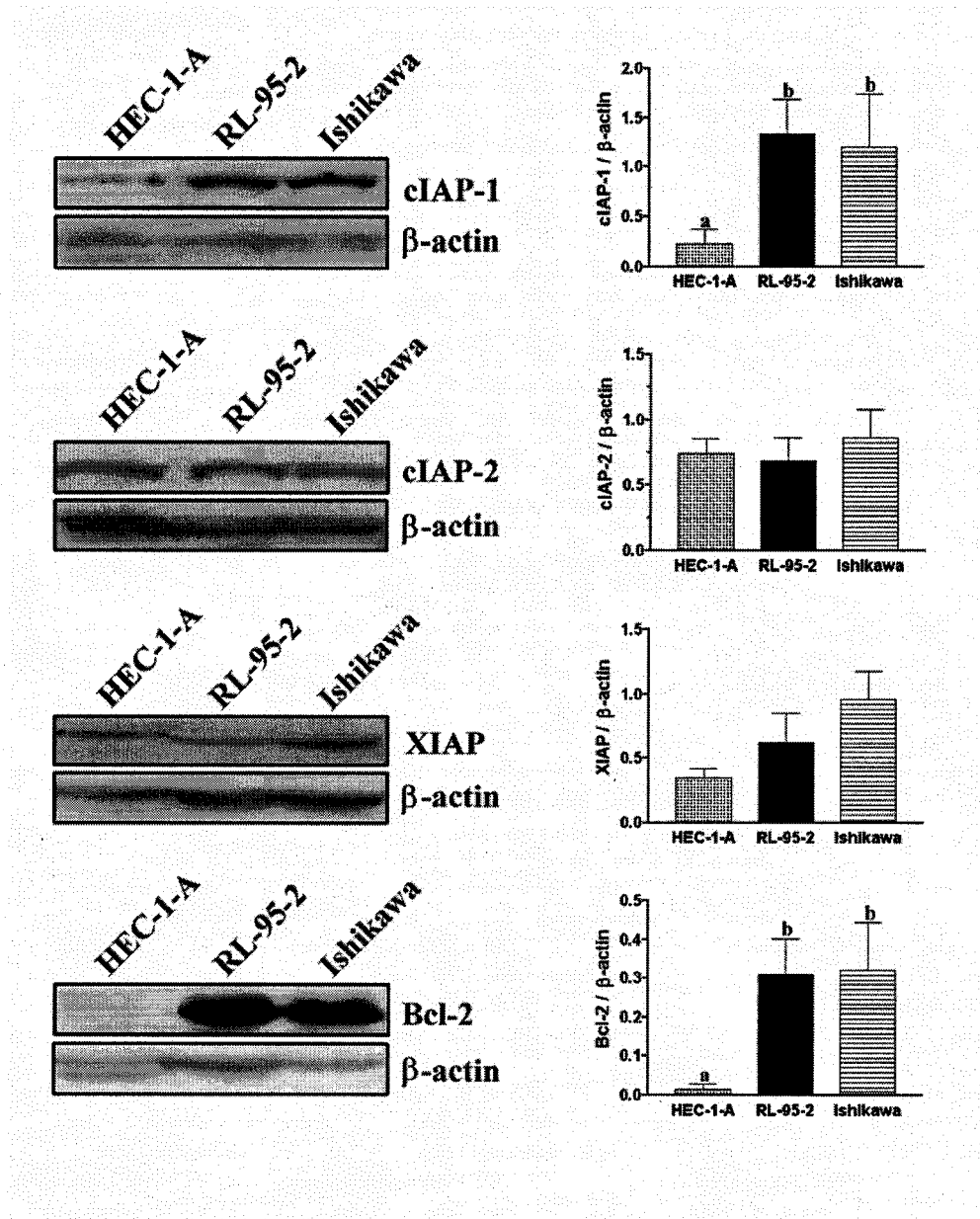


FIGURE 3 Inhibitor of apoptosis protein expression

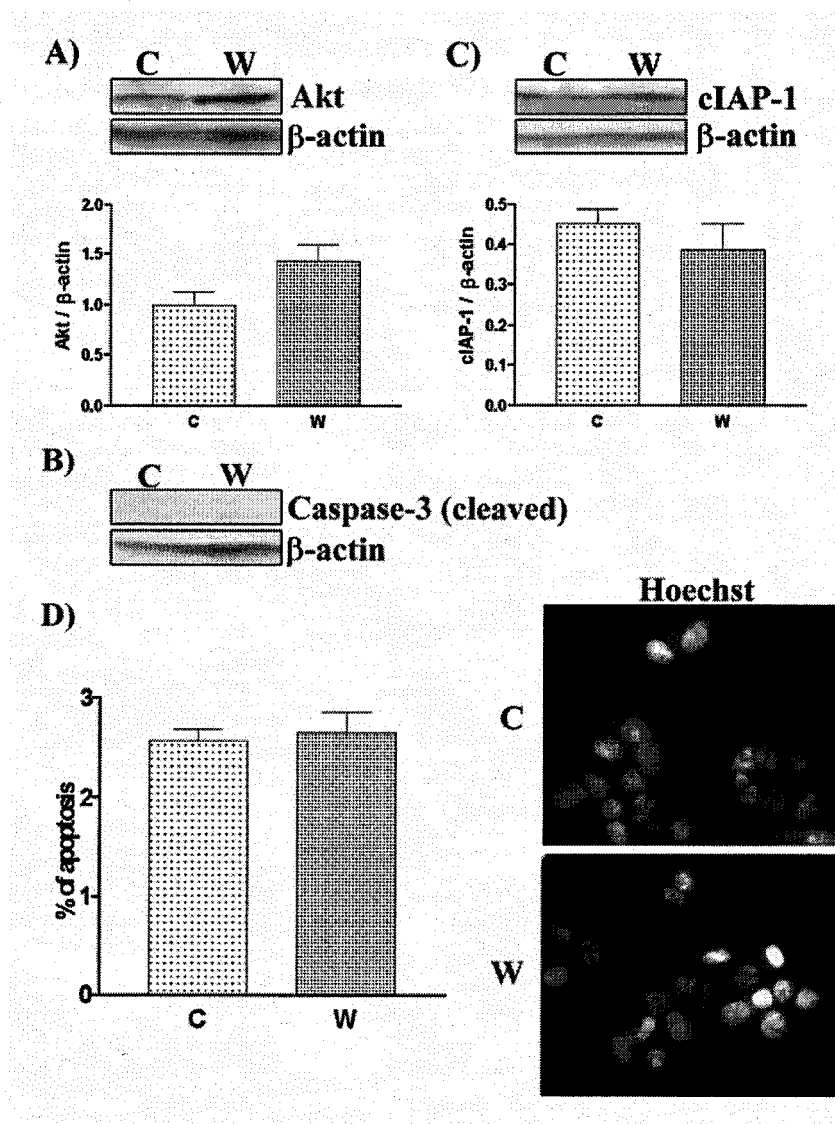


FIGURE 4 Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in HEC-1-A cells

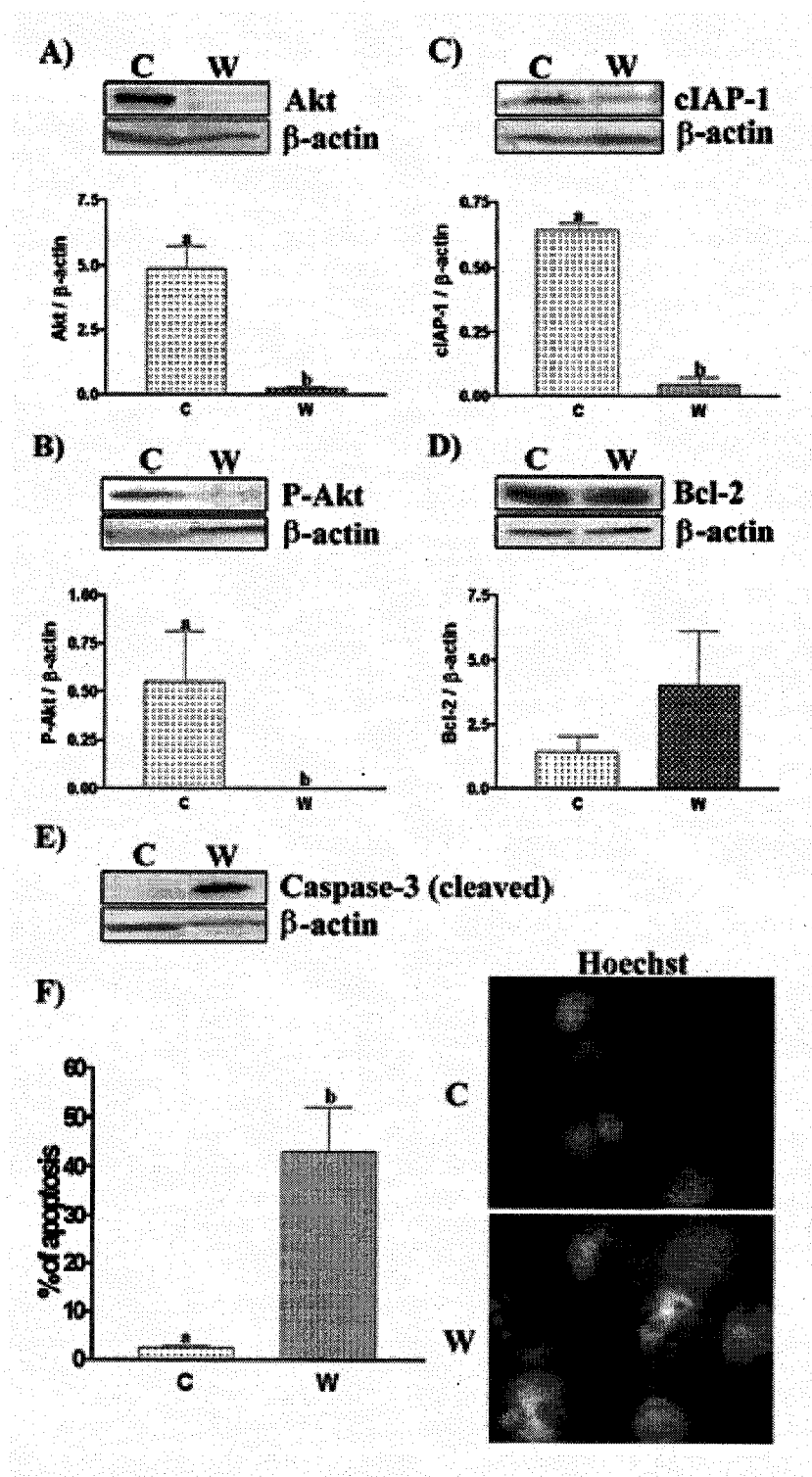


FIGURE 5 Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in RL-95-2 cells

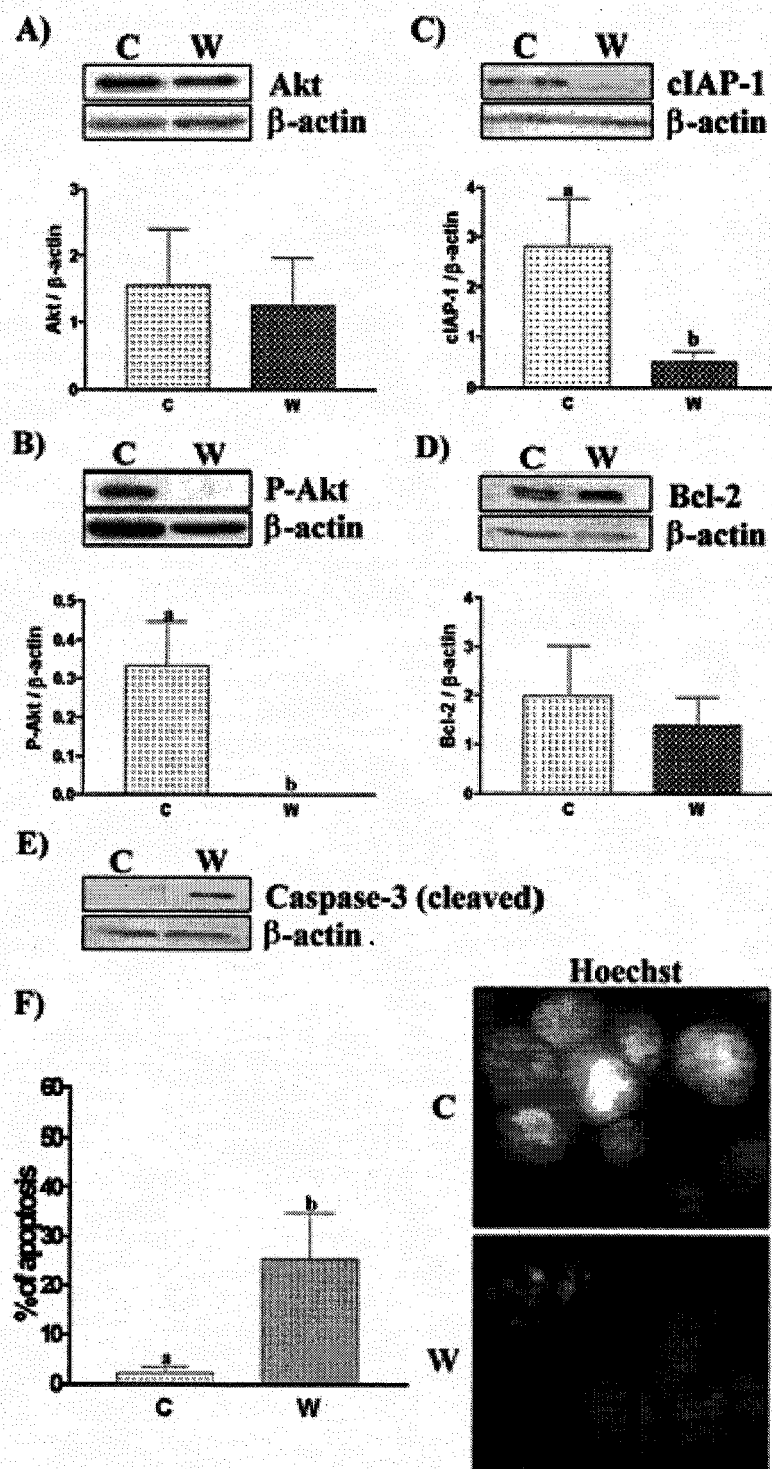


FIGURE 6 Effect of PI 3-K inhibitor on apoptosis in Ishikawa cells

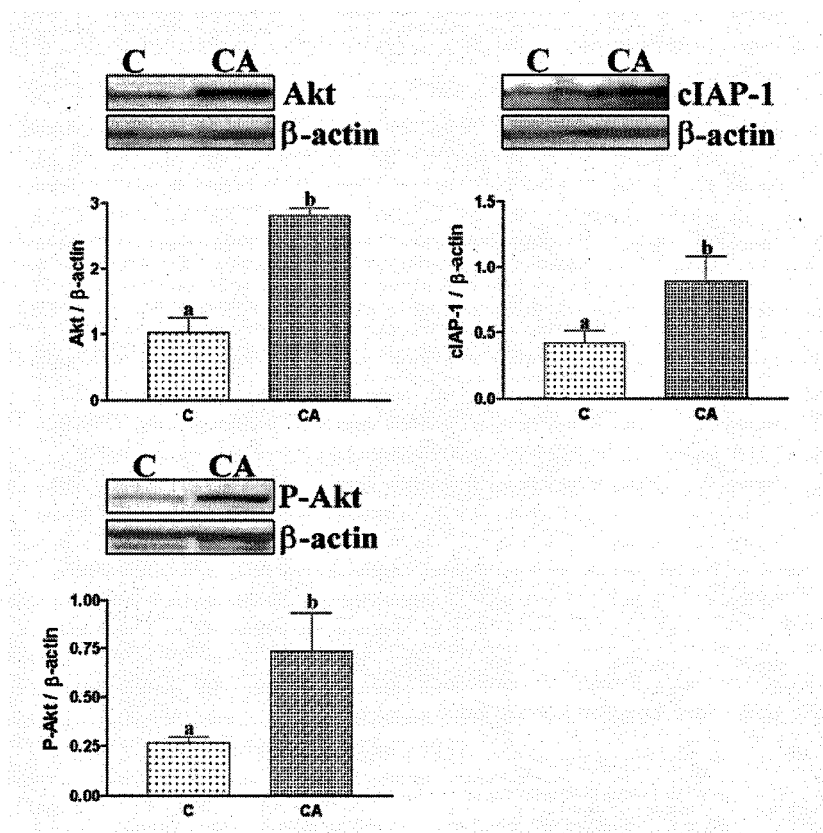


FIGURE 7 Effect of constitutively active Akt on cIAP-1 protein expression

CHAPITRE III
AKT INVOLVEMENT IN CISPLATIN CHEMORESISTANCE OF HUMAN
UTERINE CANCER CELLS

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre III (publié dans la revue *Gynecologic Oncology*, 2004; 94 : 785-795) sont : Véronique Gagnon (fait les expériences, écriture de l'article), Isabelle Mathieu (fait les expériences avec les siRNA), Émilie Sexton (participation aux expériences en relation avec le LY294002), Kim Leblanc (participation aux expériences en relation avec le LY294002) et Eric Asselin, superviseur de la thèse (correction de l'article).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

L'objectif de cette étude est d'investiguer l'implication possible de l'activité de Akt de même que de chacun de ses isoformes (Akt1, Akt2 et Akt3) lors de la résistance au cisplatine rencontrée chez les cellules du cancer de l'endomètre. Dans la présente étude, nous avons utilisé deux lignées du cancer de l'endomètre (HEC-1-A et KLE) et une lignée du cancer cervical (HeLa) reconnues toutes les trois pour avoir la protéine PTEN sauvage. Les niveaux de l'ARNm de Akt1, Akt2 et Akt3 ont été déterminés par la technique de RT-PCR en temps réel et les analyses de type Western blot ont été requises pour déterminer l'abondance des protéines de chacun des isoformes. L'ARNm de même que la protéine Akt1 sont présents chez chaque lignée étudiée. Cependant, les niveaux de Akt2 et Akt3 sont fortement exprimés chez les cellules KLE. De manière inattendue, la phosphorylation de Akt est retrouvée chez la lignée cellulaire KLE exprimant de hauts niveaux de la protéine PTEN sauvage. De plus, ces cellules semblent résistantes à l'inhibiteur de PI 3-K, indiquant que chez cette lignée, la phosphorylation de Akt peut être en partie indépendante de PI 3-K. Le cisplatine induit l'apoptose chez les cellules HeLa et HEC-1-A. Cependant, les cellules KLE exprimant les protéines Akt2 et Akt3 sont plus résistantes à cet agent chimiothérapeutique. Une diminution des niveaux des isoformes Akt1 et Akt2 de façon simultanée via l'utilisation de la technique siRNA augmente la sensibilité des cellules KLE envers le cisplatine et cause une induction de la mort cellulaire. Ces résultats suggèrent que les isoformes de Akt peuvent être impliqués lors de la résistance au cisplatine et que ces isoformes seraient de bons candidats pour la thérapie génique lors d'un cancer utérin.

AKT INVOLVEMENT IN CISPLATIN CHEMORESISTANCE OF HUMAN UTERINE CANCER CELLS

Véronique Gagnon, Isabelle Mathieu, Émilie Sexton, Kim Leblanc and Eric Asselin*

Department of Chemistry and Biology, Research Group in Cellular and Molecular
Biopathology, University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500, Trois-Rivieres, Quebec,
Canada G9A 5H7

Running title: Akt involvement in cisplatin chemoresistance

Key words: Akt, PTEN, apoptosis, siRNA, cell survival, endometrial and cervical
cancer.

* **Corresponding Author:** Eric Asselin, Ph.D.
Department of Chemistry and Biology
Medical Biology Section
University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500
Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7
E-mail: Eric_Asselin@uqtr.ca

ABSTRACT

OBJECTIVE: The aim of this study was to investigate the possible involvement of Akt activity and specific isoforms (Akt1, Akt2 and Akt3) in the resistance of human uterine cancer cells to cisplatin. **METHODS:** Two different endometrial (HEC-1-A and KLE) and one cervical (HeLa) cancer cell lines all known as wild-type PTEN (tumor suppressor phosphatase tensin homologue, a lipid phosphatase involved in the negative regulation of Akt activity) were used for these studies. **RESULTS:** Basal levels of Akt1, Akt2 and Akt3 mRNAs were determined by real-time quantitative RT-PCR studies and Western blot analyses were carried out to determine protein abundance of each isoform. Akt1 mRNA and protein were present in all cell lines studied. Akt2 and Akt3 mRNAs and proteins were strongly expressed in KLE cells. Surprisingly, Akt phosphorylation was found in KLE expressing high levels of wild-type PTEN protein. KLE cells remained resistant to PI 3-K inhibitor indicating that Akt phosphorylation might be, in part, independent of PI 3-K in this cell line. Cisplatin-induced apoptosis in HeLa and HEC-1-A cells but KLE cells expressing Akt2 and Akt3 remained more resistant to cisplatin. Knockout of Akt isoforms using specific siRNA technology increased the sensitivity of KLE cells toward cisplatin and caused a significant induction of cell death. **CONCLUSION:** Taken together these results suggest that specific Akt isoforms such as Akt2 and Akt3 might be involved in chemoresistance to cisplatin and that these isoforms could be putative targets for gene therapy in uterine cancers.

INTRODUCTION

In the Western world, endometrial cancer is the leading type of gynecological cancer and is the fourth in importance among all type of cancer in women. Although cervical cancer is less frequent compared to endometrial cancer, it has long been considered a poorly chemosensitive tumor and for several years the role of chemotherapy in the treatment of this tumour (particularly the use of cisplatin) was confined to persistent or recurrent disease after failure of surgery and/or radiotherapy [1].

Mutation of the PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten) tumor suppressor gene is a frequent event in endometrial and cervical cancers [2]. The frequency of PTEN mutations described by these investigators was several-fold higher than that described for any other gene mutated in endometrial cancers, including K-ras and p53, making PTEN mutations the most common defined genetic alteration identified to date in endometrial cancers. Many other genes have been found to be mutated in endometrial cancers such as *β-Catenin*, *MLH1*, *P27*, *Cyclin D1*, *P16*, *RB*, *BCL2*, *BAX* and estrogen and progesterone receptors (reviewed in [3]). Reported rates of PTEN inactivation in individual patient series are highly affected by the mix of tumor subtypes assembled and whether gene function is assessed by deletion mutation or the presence of PTEN protein. Loss of PTEN activity is most prevalent in the endometrioid subtype of endometrial cancers, reaching a peak rate of 83% in those tumors preceded by a histologically discrete premalignant phase [4]. 70-80% of newly diagnosed cases of endometrial cancers in the United States are of endometrioid histology [5,6]. PTEN encodes a predicted protein product of 403 amino acids containing a protein tyrosine phosphatase domain [7]. Most of tumor-associated PTEN mutations disrupt the integrity of its phosphatase domain [2,8-11]. PTEN protein dephosphorylates position D3 of phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP₃) and generates inactive PIP₂ [12]. PIP₃ is a direct product of PI 3-K and regulates PDK1, a kinase that phosphorylates and activates Akt. Thus, in a situation where wild-type PTEN is present and/or upregulated, PI 3-K/Akt survival pathway is blocked and apoptosis mechanisms may be activated. Adenovirus-mediated delivery of the wild-type PTEN gene in known PTEN-mutated

endometrial cancer cells has been shown to inhibit cell growth by induction of apoptosis [13]. A study demonstrated that phosphorylation of Akt was accompanied by the loss of PTEN in clinical specimens of endometrial carcinomas [14].

Akt is a serine/threonine protein kinase with homology to protein kinase A and C [14-17]. To date, three isoforms of Akt have been identified: Akt1, Akt2 and Akt3. Akt2 and Akt3 have 81 and 83% homology in amino acid sequences with Akt1, respectively [18]. The Thr-308 residue in the kinase domain and Ser-473 residue in the tail domain of Akt1 are phosphorylated by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) and 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-2 (PDK2), respectively, for its maximal activation in response to growth factors or cytokines. The corresponding phosphorylation sites in Akt2 (Thr-309 and Ser-474) and Akt3 (Thr-305 and Ser-472) have been identified, and Akt2 and Akt3 appear also to be regulated by PDK1 and PDK2 [19]. Studies of the expression pattern of Akt isoforms revealed that Akt1 and Akt2 are ubiquitous, whereas Akt3 is expressed predominantly in brain, heart and kidney [19-22]. In addition, gene amplification and overexpression of Akt2 in human ovarian, breast and pancreatic carcinomas have been reported [19,23-25]. A recent report suggests also a contribution of Akt3 to the aggressive phenotype of human breast cancer [19,22]. Thus, Akt seems to confer a growth advantage to tumor cells and might be an important factor involved in the control of proliferation and cell survival.

It is now widely accepted that tissue growth is not only dependent on cell proliferation, but also on the rate of apoptosis. Imbalance between these processes leads to uncontrolled tissue growth [26-28]. The tumor progression is, in part, due to the failure of the cells to undergo apoptosis in response to death signal [29]. Thus, it is generally accepted that carcinomas may be caused or promoted by factors inhibiting cell death as well as those enhancing cell survival. Since these transformed cells have to be eliminated adequately, chemotherapeutic drugs such as cisplatin are used as a treatment. However, chemoresistance is a major therapeutic hurdle. The action of cisplatin is thought to be associated with its ability to form inter- and intra-strand DNA cross-links [30]. Recent reports suggest that apoptosis may be the cellular underpinning of cisplatin-

induced cell death and that the DNA-damaging effect of cisplatin are also associated with expression of specific death genes and down-regulation of “survival” counterparts [30-33]. The present study was undertaken to determine the importance of Akt isoforms in uterine cancers and to investigate the possible involvement of Akt in the mechanisms of chemoresistance to cisplatin.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. LY294002 and Hoechst 33258 were obtained from Sigma (St. Louis, MO). DMEM/F12, Mc Coy's, FBS and PCR primers were purchased from Life Technologies (Burlington, ON). Anti-human PhosphoPlus Akt (Ser473), anti-Akt, anti cleaved-caspase-3 and anti-PTEN antibodies were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON). siRNA Akt kit was purchased from New England Biolabs (Mississauga, ON).

Cell culture. Human endometrial (HEC-1-A, KLE) and cervical (HeLa) cancer cells were obtained from ATCC. Cells were cultured in 75 cm² flasks at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. HeLa and KLE cells were maintained in DMEM/F12 supplemented with 2.438 g/L (1.34 g/L for KLE) of NaHCO₃, FBS (10%) and gentamycin (50 µg/mL). HEC-1-A cells were grown in Mc Coy's supplemented with 2.2 g/L of NaHCO₃, FBS (10%) and gentamycin (50 µg/mL). 1x10⁶ cells were plated in log growth phase in the above culture medium prior to initiation of treatment.

LY294002 treatments. HeLa, HEC-1-A and KLE cells were plated at a density of 1x10⁶ cells/well in six-well plates 24 hours before treatments. Cells were treated for 24 hours with LY294002 (0; 0.5; 5 and 50 µM). The LY294002 dose and treatment time were chosen following time-courses and dose-responses preliminary studies as determined previously [34].

MTT proliferation assay. Cells were plated at a density of 2 X 10⁴ cells/well in 96-wells plates 24 hours before the assay. Cells were cultured for 72 hrs in the presence of different concentrations of cisplatin. At the end of the culture period, 10 µL of MTT (5 mg/mL) was added to each well. After 4 hours of incubation with MTT, 100 µL of solubilization

solution was added (10% SDS in 0.01M HCl) and the microplate was incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The OD was read with Microplate reader Manager (Bio-Rad) between 550 and 600 nm.

Protein extraction and Western analysis. Cells were trypsinized, lysed in RIPA lysis buffer ((pH 7.4); 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, protease complete inhibitor (Roche), frozen and thaw three times, then centrifuged (13000 X g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated (95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electro-transferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semi-dry transfer (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked (2 hrs, RT) with PBS containing 5% milk powder and tween 0.05%, then incubated with anti-PTEN (1:1500), anti-Akt (1:2000) or anti-Phospho-PKB/Akt (1:1000) antibody (overnight, 4°C), and subsequently with Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3000; RT, 45 min). Peroxidase activity was visualized with the Super signal[®] West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time RT-PCR analysis. In order to measure abundance of Akt1, Akt2, Akt3, and PTEN mRNAs, primers were chosen as described below and tested with different primer concentrations. Total RNA (0.2 µg/µL) was used for preparation of first strand cDNA by reverse transcriptase (RT). The RNA samples were incubated (65°C, 10 min) with 2 µL oligo dT (deoxythymidine) primers in a final volume of 10 µL. Samples were then incubated (37°C, 60 min) in 20 µL of a reaction buffer (1X) containing dithiothreitol (DTT; 10 mM), deoxynucleotide triphosphates (dNTPs; 0.5 mM) and Muloney murine leukemia virus reverse transcriptase (MMLV-RT; 10 U). After cDNA synthesis, the reaction volumes were brought up to 60 µL with autoclaved water. A negative control was also included, using the same reaction mixture but without RNA to ensure absence of any contaminating genomic DNA in the RNA template.

Human Akt1 mRNA [953-1065 bp;[35]] was amplified using sense primer 5'-TCTATGGCGCTGAGATTGTG-3' and antisense primer 5'-CTTAATGTGCCCCGTCCTTGT-3'. For Akt2 mRNA, the expression was determined by amplification of 145 bp [1122-1267 bp;[35]] and the sequence of the primers were 5'-TGAAAACCTTCTGTGGGACC-3' (sense) and 5'-TGGTCCTGGTTGTAGAAGGG-3' (antisense). Expression of Akt3 was determined by amplification of a 650-bp [503-1152 bp,[21]]. Amplification was carried out using the antisense downstream sequence 5'-AAGAGCCCTGAAAGCAATGA-3' and the sense upstream sequence 5'-GTTCGAGAGAAGGCAAGTGG-3'. Human PTEN mRNA [1025-1748 bp; GenBank accession number XM_005867] was amplified using sense primer 5'-CCAGACATGACAGCCATC-3' and antisense primer 5'-GAACTTGTCTTCCCGTCG-3'. Human β -actin mRNA was amplified using sense primer 5'-GAGGATCTTCATGAGGTAGTCTGTCAGGTC-3' and antisense primer 5'-CAACTGGGACGACATGGAGAAGATCTGGCA-3'. Each reaction mixture (final volume 20 μ L) contains RT template or negative control (2 μ L), $MgCl_2$ (3 mM), primers (0.3 μ M) and LC DNA FastSTART DNA Master SYBR Green 1 (2 μ L) (Roche). Each PCR reaction was inserted in a LightCycler capillary. The PCR cycling conditions chosen were (1) 10 sec at 95°C, (2) 5 sec at 69°C (Akt 3); 67°C (PTEN); 58°C (Akt 1 and Akt 2), and (3) 26 sec (Akt 3 and PTEN); 6 sec (Akt 1 and Akt 2) at 72°C. A melting curve was generated for each reaction and the conditions were (1) 95°C, (2) 30 sec at the annealing temperature, and (3) temperature up to 95°C (0.2°C/sec). Finally, the DNA concentration of each reaction was determined quantitatively using a standard curve. β -actin was used as the control reaction. Reaction products were analysed on 1.0% agarose gels. Bands were visualized by ethidium bromide staining. PCR fragments were cloned and sequenced to confirm the corresponding sequence.

Akt siRNA. KLE cells were used and treated according to manufacturer's instructions. Briefly, 2.5×10^5 cells/well in six-well plates were plated 24 hours before siRNA transfection. Cells were transfected for 24 hours with Akt siRNA or control non-specific siRNA and were further cultured in the presence or absence of cisplatin (10 μ M) for 24

hours. Attached and floating cells were pooled for Hoechst nuclear staining and remaining cells were recovered and lysed for Western blot analysis.

Hoechst nuclear staining. Following treatment, both floating and attached cells were resuspended in 10% formalin containing Hoechst 33258 for 24 hours at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed and photographed using an Olympus BX60 fluorescence microscope and a Coolsnap-Pro CF digital Camera (Carsen Group, ON). Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted, using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the “counter” was not aware of the treatment, so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group was counted in each experiment.

Statistical analysis. All experiments were repeated a minimum of four times. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA) or student t test. Differences between experimental groups were determined by the Tukey’s test.

RESULTS

Expression of mRNA genes. To determine basal levels of Akt1, Akt2, Akt3 and PTEN mRNAs in uterine cancer cells, quantitative real-time RT-PCR studies have been carried out using specific primers chosen from human DNA sequences and amplified with the aid of the LightCycler (Roche). The presence of Akt1 was observed in all cell lines studies (Fig. 1). Akt 2 and Akt 3 mRNA were expressed in KLE cells and weakly detected in HeLa and HEC-1-A cells. The expression level of PTEN mRNA was high in KLE cell line compared with the two other cancer cell lines tested.

Protein expression and Akt phosphorylation. In order to confirm results obtained at the messenger RNA level, Western blot analyses were carried out and confirmed that PTEN was present in all cell lines, but predominant in KLE cells (Fig. 2A). Akt phosphorylation was absent in HeLa and HEC-1-A cell lines. Surprisingly, Akt phosphorylation level was strong in KLE cells, a cell line expressing high levels of wild

type PTEN protein. A faster Akt migrating band is clearly observed in KLE cells. Since a previous report clearly identified the faster Akt migrating band as Akt3 [36], we postulated that the faster migrating band observed in KLE cells might represent both phosphorylated and non-phosphorylated Akt3. To further confirm this hypothesis, specific Akt1, Akt2 and Akt3 antibodies were used for Western analyses (Fig. 2B) and confirm that Akt1 is expressed in all cell lines. Indeed, as shown at the mRNA level, Akt2 and Akt3 proteins were strongly expressed in KLE cell line.

PI 3-K inhibition experiments. Given that KLE cells express high levels of wild-type PTEN protein, it was surprising to find high levels of Akt phosphorylation in this cell line (Fig. 2A). As determined previously in mutated PTEN endometrial cancer cell lines [34,37], we asked whether PI 3-K inhibition could lead to a decrease of Akt phosphorylation and an induction of apoptosis. In order to answer these questions, phospho-Akt expressing cell (KLE) and phospho-Akt negative cells (HeLa and HEC-1-A) were cultured in the presence of LY294002 for 24 hours (Fig. 3, 4 and 5). PI 3-K inhibitor had no effect at the physiological dose tested (0.5 and 5 μ M) in the three cell lines tested indicating that inhibition of PI 3-K activity is not sufficient to block Akt phosphorylation in KLE cells. A higher dose was used (50 μ M) to determine if the inhibitor could induce apoptosis independently of PI 3-K pathway. At 50 μ M, LY294002 significantly reduced Akt protein expression in HeLa and KLE cells. However, the level of Akt1, Akt2 and Akt3 mRNAs were not significantly different. In KLE cells, Akt phosphorylation is significantly reduced at the 50 μ M dose, but not abolished after 24 hours of treatment (Fig. 5C). Furthermore, treatment of cells at 50 μ M of LY294002 significantly induced apoptosis as demonstrated by Hoechst nuclear staining. To confirm that LY294002 induced apoptosis at this dose, Western analyses were performed using a specific cleaved caspase-3 antibody and showed the presence of caspase-3 activity in all cell lines. Since we have previously showed that Akt is a direct target of caspase-3 [32], downregulation of Akt protein might be explained by the activation of caspase-3. Indeed, these results clearly show that LY294002 induces apoptosis independently of PI 3-K.

Cisplatin decreases cell proliferation and induces apoptosis. To determine the effect of cisplatin, endometrial and cervical cancer cells were treated with different concentrations of this chemotherapeutic agent (Fig. 6). Cisplatin induced a dose-dependent and time-dependent decrease in cell proliferation of HeLa and HEC-1-A cells. However, KLE cells expressing Akt2 and Akt3 remained less sensitive to cisplatin. After 72 hours of treatment at the maximal dose used, cisplatin reduced cell proliferation of KLE, HEC-1-A and HeLa of 30%, 75% and 90% respectively. Results further demonstrate that cisplatin induces killing of cells through apoptosis activation (Fig. 7).

Akt downregulation increases cisplatin-induced apoptosis. The presence of Akt2 and Akt3 isoforms were found highly expressed and phosphorylated in KLE cells and we found that these cells were more resistant to cisplatin. Thus, we used a specific siRNA procedure to directly downregulate all Akt isoforms in KLE cells to further determine the action of cisplatin in these cells (Fig.7). As hypothesised, Akt1 and Akt2 downregulation by siRNA in KLE cells resulted in the induction of apoptosis in response to cisplatin as compared to control. Inhibition of Akt isoforms was therefore sufficient to allow cisplatin-induced apoptosis in this cell line.

DISCUSSION

Although chemotherapeutic agents such as cisplatin are widely used for the treatment of endometrial and cervical cancers, chemoresistance remains a major therapeutic difficulty, and the molecular mechanisms leading to chemoresistance are poorly understood. In the present study, we have demonstrated that Akt activity is directly involved in chemoresistance to cisplatin. It was a surprise to find Akt phosphorylation in KLE cells since it is a wild-type expressing PTEN cancer cell line. PTEN is the first tumor suppressor gene identified in the phosphatase family, and the principal function of its gene product appears to be dephosphorylation of the second-messenger PIP₃ [7]. The expression of PTEN in two independent glioblastoma cell lines results in the disruption of signalling downstream of PI 3-K to Akt and Bad [38]. Thus, when PTEN is present Akt phosphorylation is blocked and apoptosis mechanisms may be activated. However, we found high levels of PTEN protein in KLE cells. Thus, the presence of PTEN is not

sufficient to block Akt phosphorylation in KLE cells. The explanation for this discrepancy may be the presence of Akt2 and Akt3 proteins in this cell line and these isoforms might be regulated differently as compared to Akt1 isoform.

To further investigate the possible role of PI 3-K in the regulation of Akt phosphorylation in KLE cells, we examined the influence of PI 3-K inhibitor LY294002. We have showed previously in two mutated PTEN endometrial cancer cells (Ishikawa and RL-95-2) that LY294002 reduced Akt phosphorylation in a dose-dependent manner [34,37]. In the present study using wild-type PTEN cell lines, LY294002 decreased Akt protein (HeLa and HEC-1-A) and both Akt and pospho-Akt levels (KLE) at the highest dose tested (50 μ M). Furthermore, caspase-3 cleaved fragments and apoptosis were observed at 50 μ M of LY294002. Since phosphorylation of Akt is not observed in HeLa and HEC-1-A, the results show that LY294002-induced caspase-3 cleavage and apoptosis is independent of PI 3-K, and that a similar situation is observed in KLE cells. Besides, LY294002 had no significant effect on Akt1, Akt2 and/or Akt3 mRNA expression, suggesting that LY294002 does not act on gene expression and that Akt protein is processed after caspase-3 cleavage/activation as demonstrated previously in other human cancer cell lines [32]. The results confirm that PI 3-K inhibition at a lower dose does not reduce Akt phosphorylation in KLE cell line and suggest that the activation of Akt in KLE cells is independent of PI 3-K action and activity.

The antitumor agent cisplatin is a DNA-reactive reagent widely used as a chemotherapeutic drug in the treatment of various human malignancies. Cisplatin treatment causes cell cycle arrest at various phases in the cell cycle and induces apoptosis [39]. To determine the effect of cisplatin on endometrial and cervical cancer cell lines, we have used the conversion of MTT formazan assay. In presence of cisplatin, proliferation of HeLa and HEC-1-A cells was significantly decreased. However, after 72 hours of cisplatin treatment, inhibition of KLE cell proliferation did not reached IC₅₀ indicating that KLE cells are less sensitive to this chemotherapeutic agent. The current results also demonstrate that cisplatin induces apoptosis through the activation of the caspase-3 signalling pathway. Since KLE is the only cell line to express high levels of

all Akt active (phosphorylated) isoforms, we hypothesized that the high Akt activity in this cell line might be responsible for its resistance to cisplatin. Given that Akt has emerged as a possible explanation for chemoresistance in some other cancer cell lines, we sought to determine the involvement of its isoforms in uterine cancer cells.

In order to fully confirm that Akt2 and Akt3 isoforms in KLE might be directly involved in cisplatin chemoresistance, we used the siRNA technology to specifically block Akt1 and Akt2 isoforms and further tested the effect of cisplatin in these resistant cells. As hypothesized, cisplatin significantly induced apoptosis when Akt1 and Akt2 isoforms were downregulated, suggesting that Akt1 and Akt2 activities in KLE cells are involved directly or indirectly via the regulation of survival factors and/or inhibitor of apoptosis proteins in the chemoresistance of cancer cells. Whether proteins interacting specifically with Akt3 and/or Akt2 such as APPL [40] might be involved in the process of chemoresistance should be taken into consideration. A recent study has shown that cisplatin-sensitive ovarian cancer cells transfected with constitutively active Akt2 became resistant to cisplatin, whereas overexpression of dominant negative Akt2 rendered cisplatin-resistant ovarian cancer cells susceptible to cisplatin-induced apoptosis [41]. Another recent study showed that expression of a constitutively active Akt2 prevented cisplatin-mediated down-regulation of XIAP, an inhibitor of apoptosis protein, and apoptosis in A2780s surface epithelial ovarian cancer cells [42]. Given that XIAP is involved directly or indirectly in the regulation of Akt activity [32] and that Akt has been shown to be directly involved in the up-regulation of cIAP-1 gene and protein expression [34], it is possible that the chemoresistance observed might be due, in part, to the presence of increased levels of these inhibitor of apoptosis proteins. Recently, XIAP has also been shown to be a downstream target of Akt and thus, a potentially important mediator of Akt effect on cell survival [43]. In addition, it was previously reported that inhibition of tumorigenicity of pancreatic cancer cell lines may be induced by antisense Akt2 transfection [23] which suggests that Akt isoforms might be involved differently or independently from each other in the regulation of growth of cancer cells.

Taken together, these data suggest that Akt pathway is a critical target for endometrial cancer intervention and that activation of this pathway is associated with chemoresistance in human uterine cancers. Furthermore, these results suggest that specific Akt isoforms might be involved in chemoresistance to cisplatin and that these specific isoforms could be putative candidates for gene therapy. Further studies will be necessary to determine more specifically which isoforms of Akt are involved in cisplatin chemoresistance and to determine the possible involvement of other death and/or survival factors in this process.

ACKNOWLEDGEMENTS

A grant from the Fond de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and the Canadian Institute of Health Research (CIHR; MOP-66987) have supported this work. Eric Asselin is a recipient of a fellowship from FRSQ. Véronique Gagnon and Émilie Sexton are recipient of a NSERC scholarship. Isabelle Mathieu and Kim Leblanc are recipient of a FRSQ scholarship.

REFERENCES

1. Buda A, Dell'Anna T, Signorelli M, Mangioni C. Role of Ifosfamide in cervical cancer: an overview. *Oncology* 2003; 65 Suppl 2:63-66.
2. Risinger JJ, Hayes K, Maxwell GL, Carney ME, Dodge RK, Barrett JC, Berchuck A. PTEN mutation in endometrial cancers is associated with favorable clinical and pathologic characteristics. *Clin. Cancer Res.* 1998; 4:3005-10.
3. Fuller AF, Seiden MV, Young RH. Uterine cancer. In: American cancer society atlas of clinical oncology. 2004. Hamilton, London, BC Decker Inc.
4. Mutter GL, Lin MC, Fitzgerald JT, Kum JB, Baak JP, Lees JA, Weng LP, Eng C. Altered PTEN expression as a diagnostic marker for the earliest endometrial precancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2000; 92:924-30.
5. Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 1983; 15:10-17.
6. Deligdisch L, Holinka CF. Endometrial carcinoma: two diseases? *Cancer Detect Prev* 1987; 10:237-46.
7. Ali IU, Schriml LM, Dean M. Mutational spectra of PTEN/MMAC1 gene: a tumor suppressor with lipid phosphatase activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1999; 91:1922-32.
8. Marsh DJ, Dahia PL, Caron S, Kum JB, Frayling IM, Tomlinson IP, Hughes KS, Eeles RA, Hodgson SV, Murday VA, Houlston R, Eng C. Germline PTEN mutations in Cowden syndrome-like families. *J. Med. Genet.* 1998; 35:881-85.
9. Rasheed BK, Stenzel TT, McLendon RE, Parsons R, Friedman AH, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH. PTEN gene mutations are seen in high-grade but not in low-grade gliomas. *Cancer Res.* 1997; 57:4187-90.
10. Risinger JJ, Hayes AK, Berchuck A, Barrett JC. PTEN/MMAC1 mutations in endometrial cancers. *Cancer Res.* 1997; 57:4736-38.
11. Tashiro H, Blazes MS, Wu R, Cho KR, Bose S, Wang SI, Li J, Parsons R, Ellenson LH. Mutations in PTEN are frequent in endometrial carcinoma but rare in other common gynecological malignancies. *Cancer Res.* 1997; 57:3935-40.
12. Machama T, Dixon JE. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:13375-78.
13. Sakurada A, Hamada H, Fukushima S, Yokoyama T, Yoshinaga K, Furukawa T, Sato S, Yajima A, Sato M, Fujimura S, Horii A. Adenovirus-mediated delivery

of the PTEN gene inhibits cell growth by induction of apoptosis in endometrial cancer. *Int. J. Oncol.* 1999; 15:1069-74.

14. Kanamori Y, Kigawa J, Itamochi H, Shimada M, Takahashi M, Kamazawa S, Sato S, Akeshima R, Terakawa N. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 2001; 7:892-95.
15. Bellacosa A, Testa JR, Staal SP, Tsichlis PN. A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. *Science* 1991; 254:274-77.
16. Coffey PJ, Woodgett JR. Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. *Eur. J. Biochem.* 1991; 201:475-81.
17. Jones PF, Jakubowicz T, Pitossi FJ, Maurer F, Hemmings BA. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991; 88:4171-75.
18. Vanhaesebroeck B, Alessi DR. The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 2000; 346 Pt 3:561-76.
19. Walker KS, Deak M, Paterson A, Hudson K, Cohen P, Alessi DR. Activation of protein kinase B beta and gamma isoforms by insulin in vivo and by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 in vitro: comparison with protein kinase B alpha. *Biochem. J.* 1998; 331:299-308.
20. Brodbeck D, Cron P, Hemmings BA. A human protein kinase Bgamma with regulatory phosphorylation sites in the activation loop and in the C-terminal hydrophobic domain. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:9133-36.
21. Masure S, Haefner B, Wesselink JJ, Hoefnagel E, Mortier E, Verhasselt P, Tuytelaars A, Gordon R, Richardson A. Molecular cloning, expression and characterization of the human serine/threonine kinase Akt-3. *Eur. J. Biochem.* 1999; 265:353-60.
22. Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, Weigel RJ, Roth RA. Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 257:906-10.
23. Cheng JQ, Ruggeri B, Klein WM, Sonoda G, Altomare DA, Watson DK, Testa JR. Amplification of Akt2 in human pancreatic cells and inhibition of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93:3636-41.
24. Cheng JQ, Godwin AK, Bellacosa A, Taguchi T, Franke TF, Hamilton TC, Tsichlis PN, Testa JR. Akt2, a putative oncogene encoding a member of a

subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992; 89:9267-71.

25. Miwa W, Yasuda J, Murakami Y, Yashima K, Sugano K, Sekine T, Kono A, Egawa S, Yamaguchi K, Hayashizaki Y, Sekiya T. Isolation of DNA sequences amplified at chromosome 19q13.1-q13.2 including the Akt2 locus in human pancreatic cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 225:968-74.
26. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994; 73:2013-26.
27. Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* 1994; 124:1-6.
28. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267:1456-62.
29. Naik P, Karrim J, Hanahan D. The rise and fall of apoptosis during multistage tumorigenesis: down-modulation contributes to tumor progression from angiogenic progenitors. *Genes Dev.* 1996; 10:2105-16.
30. Li J, Sasaki H, Sheng YL, Schneiderman D, Xiao CW, Kotsuji F, Tsang BK. Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is XIAP a determinant? *Biol. Signals Recept.* 2000; 9:122-30.
31. Arts HJ, Van Der Zee AG, De Jong S, De Vries EG. Options for modulation of drug resistance in ovarian cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* 2000; 10:47-52.
32. Asselin E, Mills GB, Tsang BK. XIAP regulates Akt activity and caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells. *Cancer Res.* 2001; 61:1862-68.
33. Schneiderman D, Kin J-M, Senterman M, Tsang BK. Sustained suppression of Fas ligand expression in cisplatin-resistant human ovarian surface epithelial cancer cells. *Apoptosis* 1999; 4:271-82.
34. Gagnon V, St-Germain ME, Parent S, Asselin E. Akt activity in endometrial cancer cells: regulation of cell survival through cIAP-1. *Int. J. Oncol.* 2003; 23:803-10.
35. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues Akt1 and Akt2: amplification of Akt1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1987; 84:5034-37.
36. Okano J, Gaslightwala I, Birnbaum MJ, Rustgi AK, Nakagawa H. Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation. *J. Biol. Chem.* 2000; 275:30934-42.

37. St-Germain ME, Gagnon V, Mathieu I, Parent S, Asselin E. Akt regulates COX-2 mRNA and protein expression in mutated-PTEN human endometrial cancer cells. *Int. J. Oncol.* 2004; 24:1311-24.
38. Myers MP, Pass I, Batty IH, Van der KJ, Stolarov JP, Hemmings BA, Wigler MH, Downes CP, Tonks NK. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95:13513-18.
39. Mitsuuchi Y, Johnson SW, Selvakumaran M, Williams SJ, Hamilton TC, Testa JR. The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signal transduction pathway plays a critical role in the expression of p21WAF1/CIP1/SDI1 induced by cisplatin and paclitaxel. *Cancer Res.* 2000; 60:5390-5394.
40. Mitsuuchi Y, Johnson SW, Sonoda G, Tanno S, Golemis EA, Testa JR. Identification of a chromosome 3p14.3-21.1 gene, APPL, encoding an adaptor molecule that interacts with the oncoprotein-serine/threonine kinase Akt2. *Oncogene* 1999; 18:4891-98.
41. Cheng JQ, Jiang X, Fraser M, Li M, Dan HC, Sun M, Tsang BK. Role of X-linked inhibitor of apoptosis protein in chemoresistance in ovarian cancer: possible involvement of the phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway. *Drug Resist. Updat.* 2002; 5:131-46.
42. Fraser M, Leung BM, Yan X, Dan HC, Cheng JQ, Tsang BK. p53 is a determinant of X-linked inhibitor of apoptosis protein/Akt-mediated chemoresistance in human ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2003; 63:7081-88.
43. Dan HC, Sun M, Kaneko S, Feldman RI, Nicosia SV, Wang HG, Tsang BK, Cheng JQ. Akt phosphorylation and stabilization of XIAP. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:5405-12.

FIGURE LEGENDS

- Figure 1** Akt1, Akt2, Akt3 and PTEN mRNA abundance in cervical (HeLa) and endometrial (HEC-1-A and KLE) cancer cell lines as determined by quantitative real-time RT-PCR. β -actin was used as control to correct for loading. Densitometric analyses were performed using the LightCycler (Roche) and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent mean \pm SEM of 6 independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
- Figure 2** (A) Akt, Phospho-Akt and PTEN protein abundance in cervical (HeLa) and endometrial (HEC-1-A and KLE) cancer cell lines as determined by Western blot analyses. (B) Akt1, Akt2 and Akt3 protein abundance. β -actin was used as control to correct for loading. The upper band was used for densitometric analyses. Densitometric analyses were performed using BIO-RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/ β -actin). Results represent mean \pm SEM of 6 independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).
- Figure 3** Effect of LY294002 on apoptosis in HeLa cells. 1×10^6 cells were plated for 24 h and cultured for another 24 h in culture medium containing LY294002 (0; 0.5; 5 and 50 μ M). Cells were trypsinized, pooled (attached and floating) and collected for Hoechst nuclear staining to count nuclear fragmentation and apoptotic cells. Western analysis was performed on total protein content for (A) Akt protein and (C) cleaved caspase-3 protein. (B) Akt1 and Akt2 mRNAs as determined by quantitative real time RT-PCR. (C) Representative micrograph of Hoechst staining and % of apoptosis. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments.
- * Significantly different from other doses tested ($p < 0.05$).

Figure 4

Effect of LY294002 on apoptosis in HEC-1-A cells. 1×10^6 cells were plated for 24 h and cultured for another 24 h in culture medium containing LY294002 (0; 0.5; 5 and 50 μM). Cells were trypsinized, pooled (attached and floating) and collected for Hoechst nuclear staining to count nuclear fragmentation and apoptotic cells. Western analysis was performed on total protein content for (A) Akt protein and (C) cleaved caspase-3 protein. (B) Akt1 and Akt2 mRNAs as determined by quantitative real time RT-PCR. (C) Representative micrograph of Hoechst staining and % of apoptosis. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

* Significantly different from other doses tested ($p < 0.05$).

Figure 5

Effect of LY294002 on apoptosis in KLE cells. 1×10^6 cells were plated for 24 h and cultured for another 24 h in culture medium containing LY294002 (0; 0.5; 5 and 50 μM). Cells were trypsinized, pooled (attached and floating) and collected for Hoechst nuclear staining to count nuclear fragmentation and apoptotic cells. Western analysis was performed on total protein content for (A) Akt protein, (C) phospho-Akt protein and (D) cleaved caspase-3 protein. (B) Akt1, Akt2 and Akt3 mRNAs as determined by quantitative real time RT-PCR. (D) Representative micrograph of Hoechst staining and % of apoptosis. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

* Significantly different from other doses tested ($p < 0.05$).

Figure 6

Influence of cisplatin on cell proliferation as determined by conversion of MTT formazan. 2×10^4 cells were plated for 24 h and cultured in the presence of increasing doses of cisplatin for 72 hours (0; 0.63; 1.25; 2.5; 5; 10; 20; 40 μM). HeLa cell line is represented by a dark square, HEC-1-A by an open circle and KLE by a dark triangle. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments.

Figure 7

siRNA Akt downregulation effect on cisplatin-induced apoptosis in KLE cells. KLE cells were transfected with siRNA Akt. Control cells (non specific siRNA) and Akt1 and Akt2 siRNA groups were cultured for 24 hours in the presence or absence of cisplatin (10 μ M). Cells were then trypsinized, pooled (attached and floating) and collected for Hoechst nuclear staining to count nuclear fragmentation and apoptotic cells. A minimum of 200 cells per treatment group was counted in each experiment. Data represent the mean \pm SEM of 4 independent experiments. The remaining cells were lysed and protein lysates were used to measure Akt, phospho-Akt and specific cleaved caspase-3 abundance by Western analyses. p42/MAPK antibody was used as suggested by the siRNA kit manufacturer as an internal control for Akt downregulation. Densitometric analyses were performed using BIO-RAD gel doc system and are presented as a ratio (value/p42/MAPK). Results represent mean \pm SEM of 4 independent experiments.

* Significantly different compared to controls ($p < 0.05$).

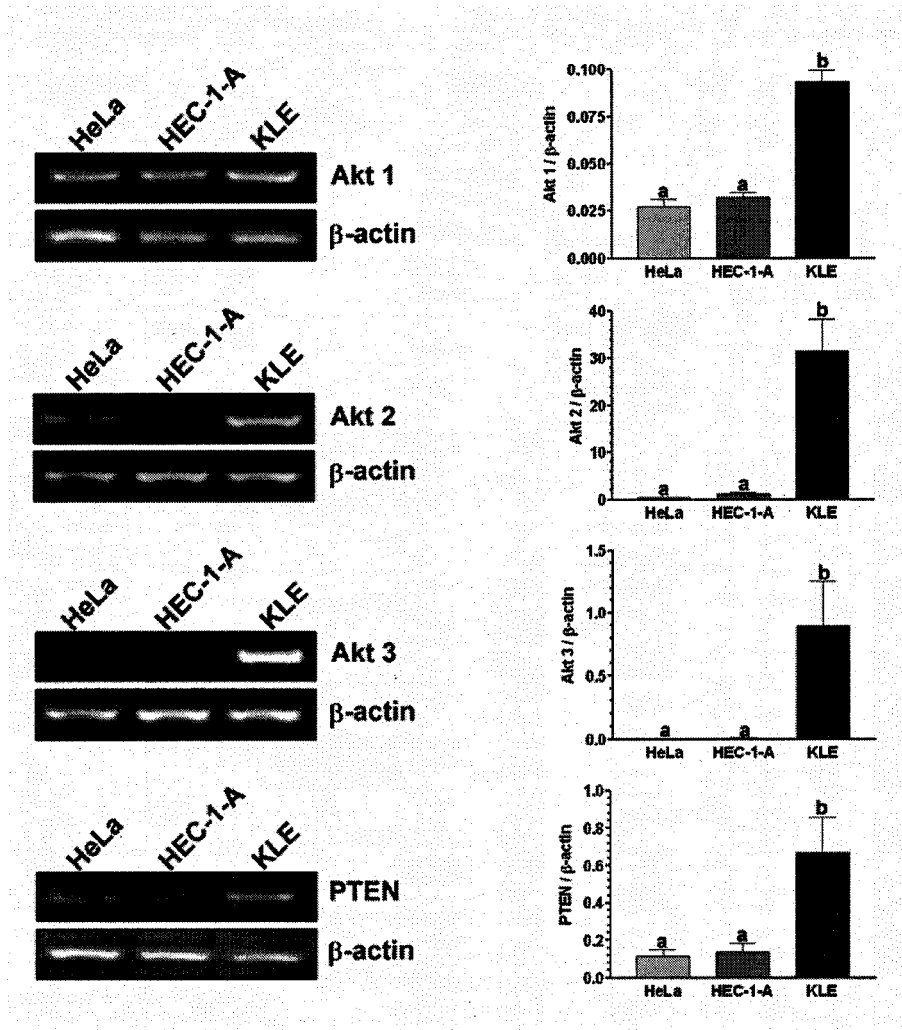


FIGURE 1 Expression of mRNA genes

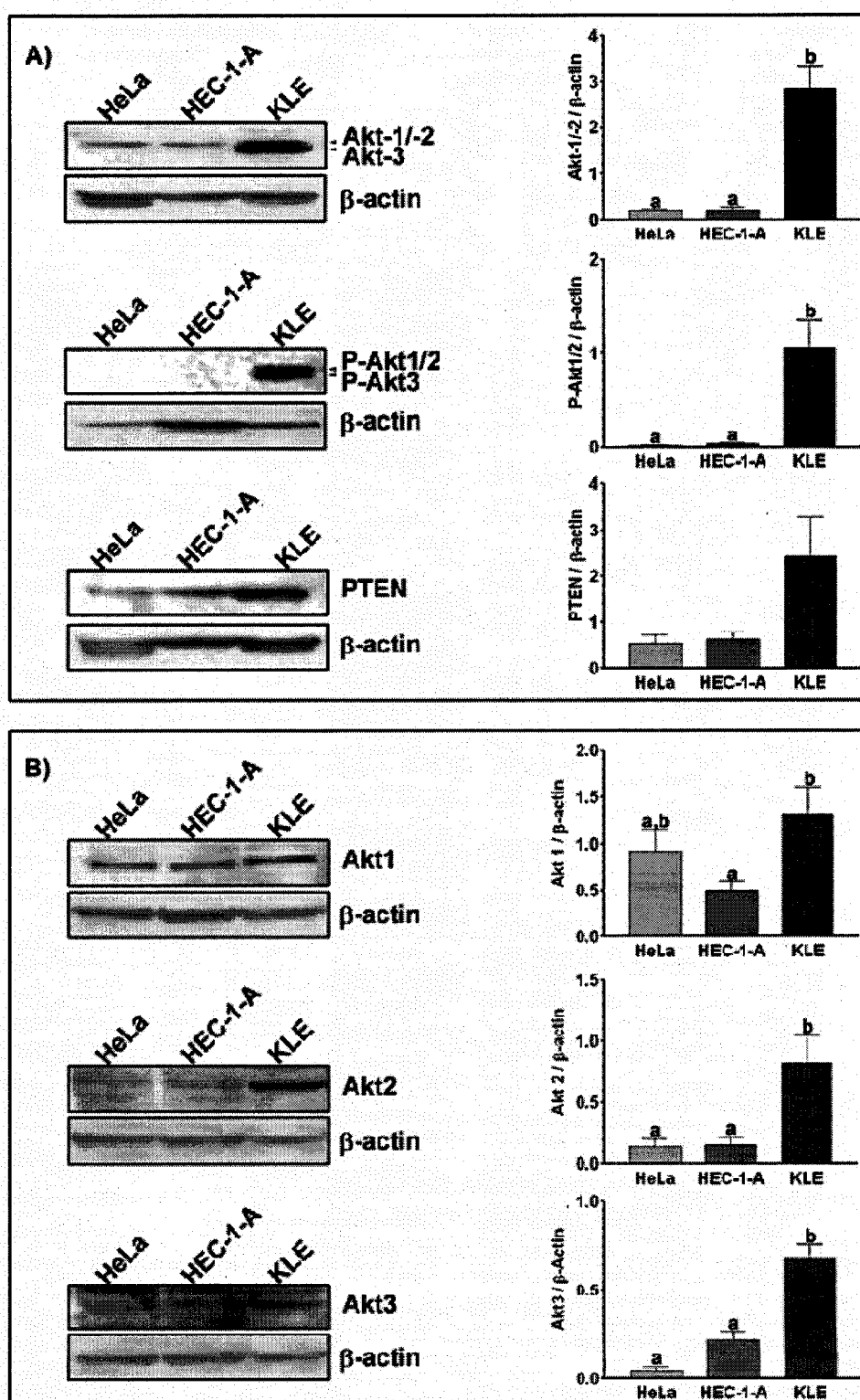


FIGURE 2 Protein expression and Akt phosphorylation

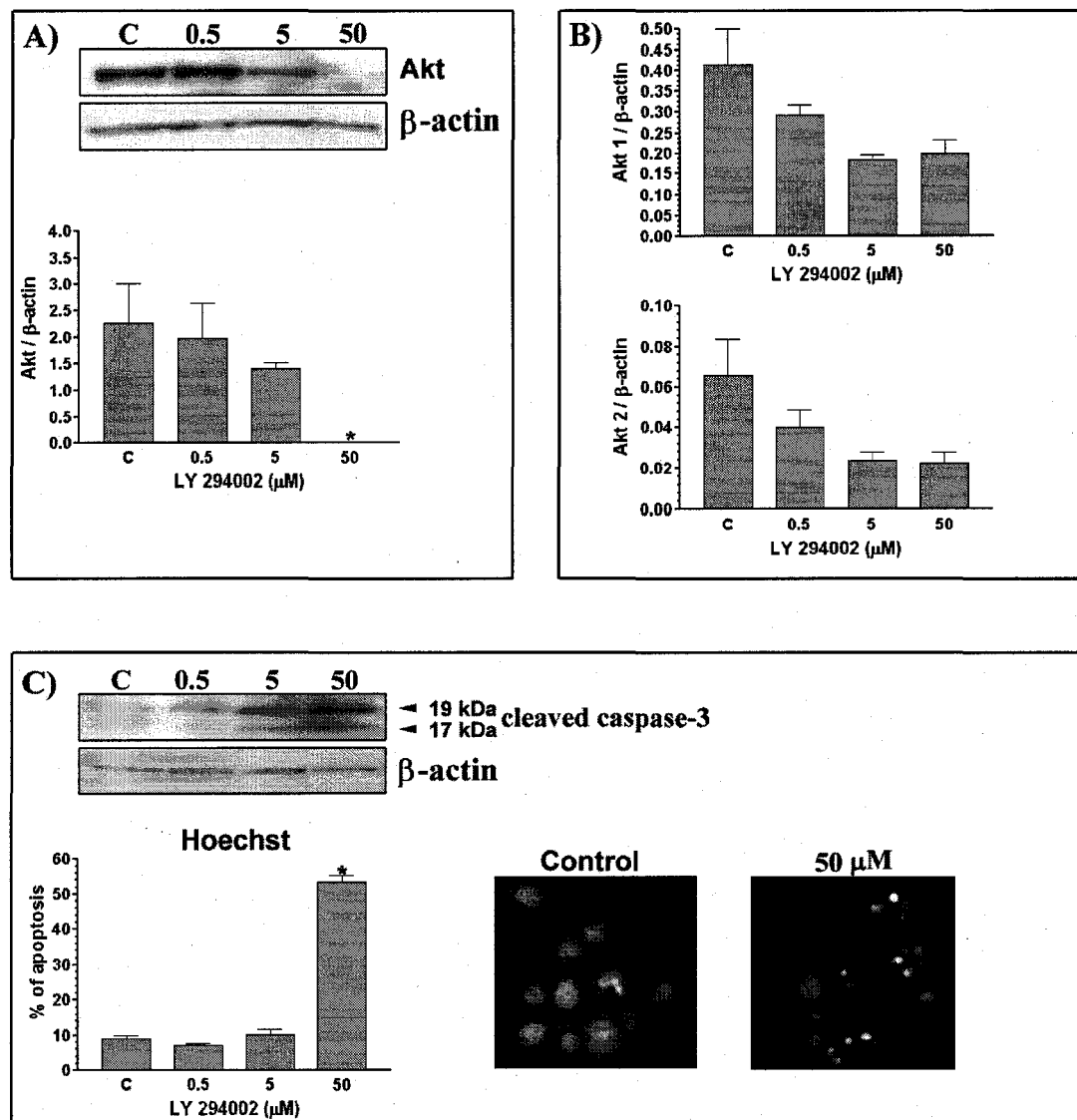


FIGURE 3 Effect of LY294002 on apoptosis in HeLa cells

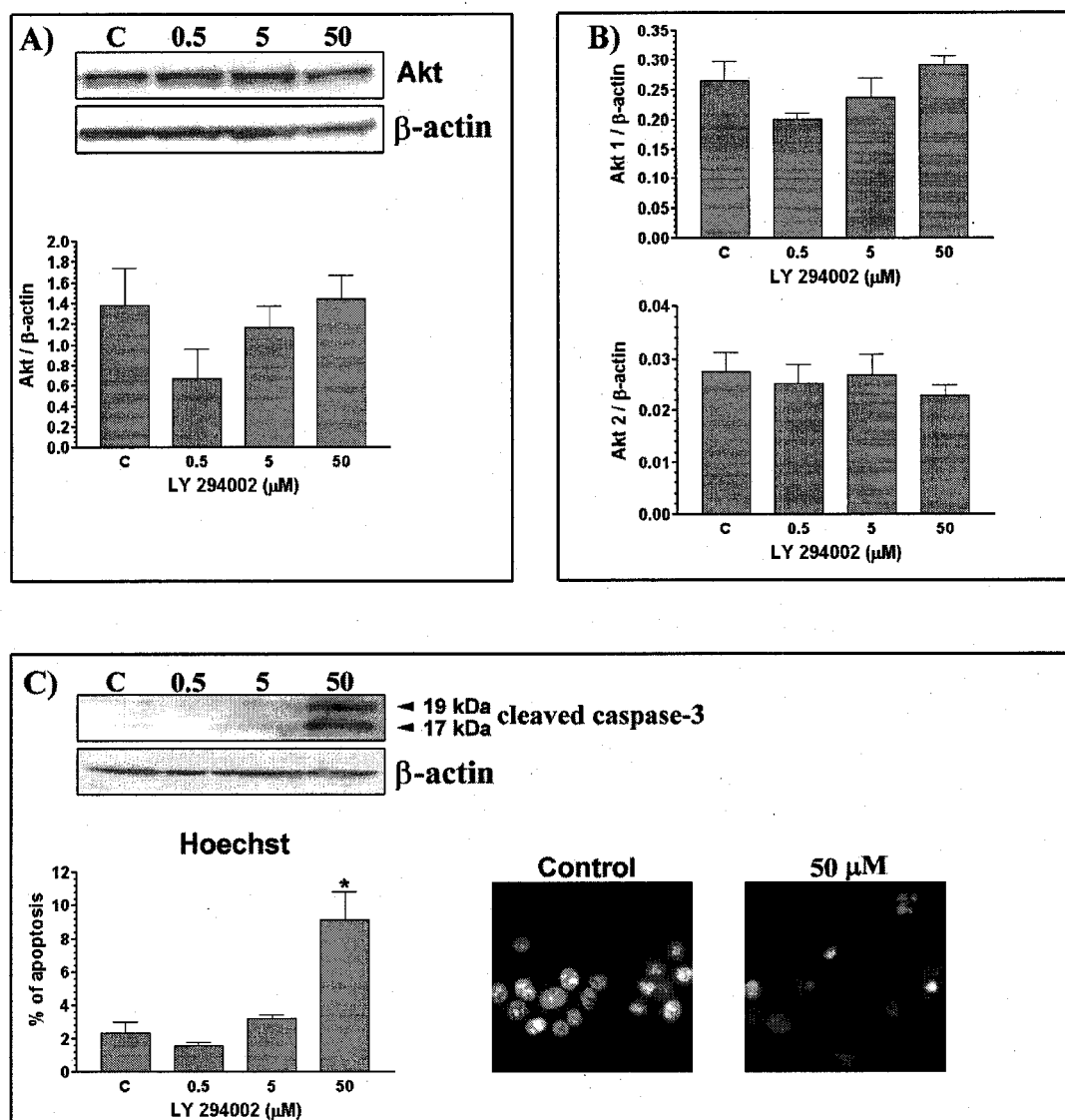


FIGURE 4 Effect of LY294002 on apoptosis in HEC-1-A cells

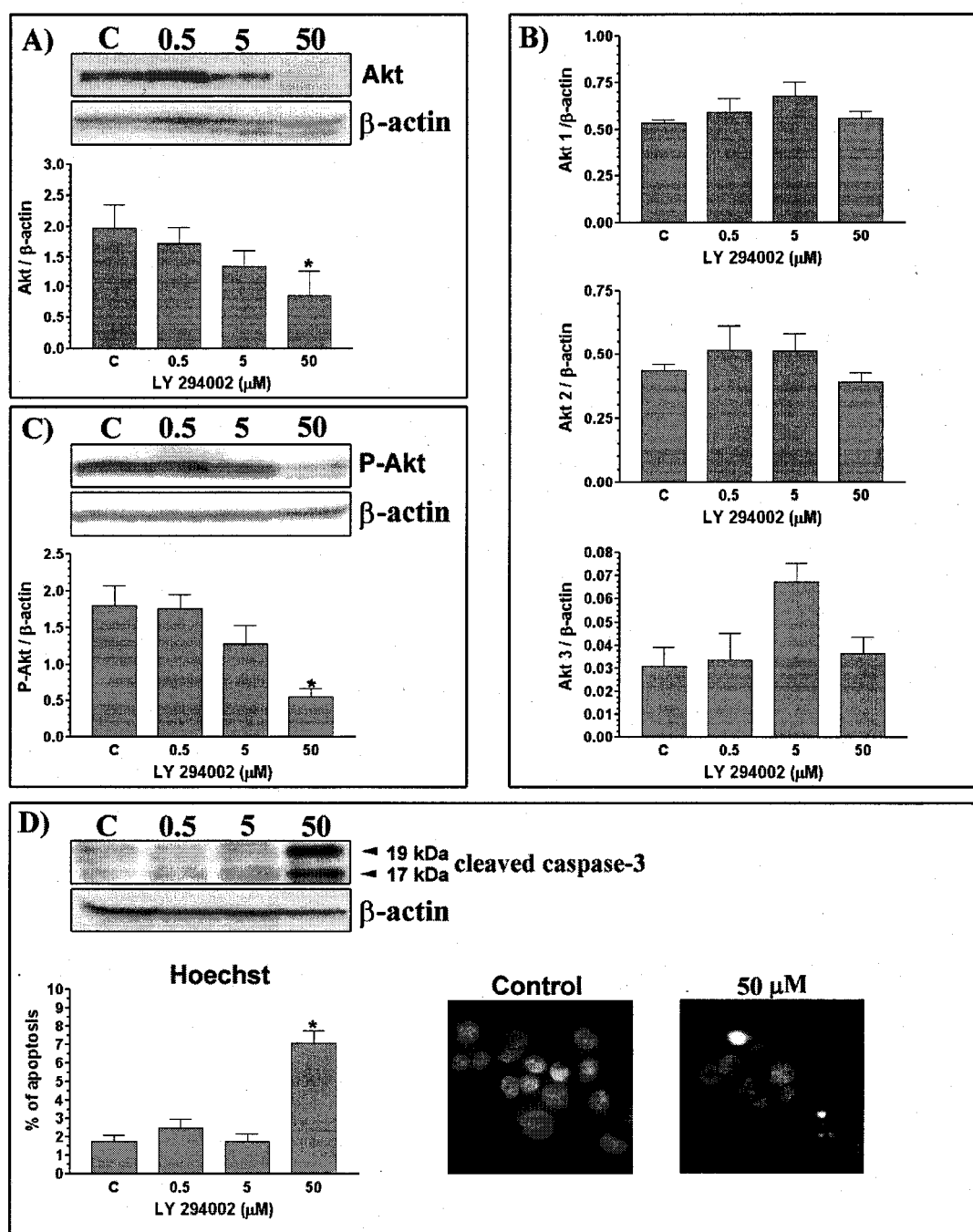


FIGURE 5 Effect of LY294002 on apoptosis in KLE cells

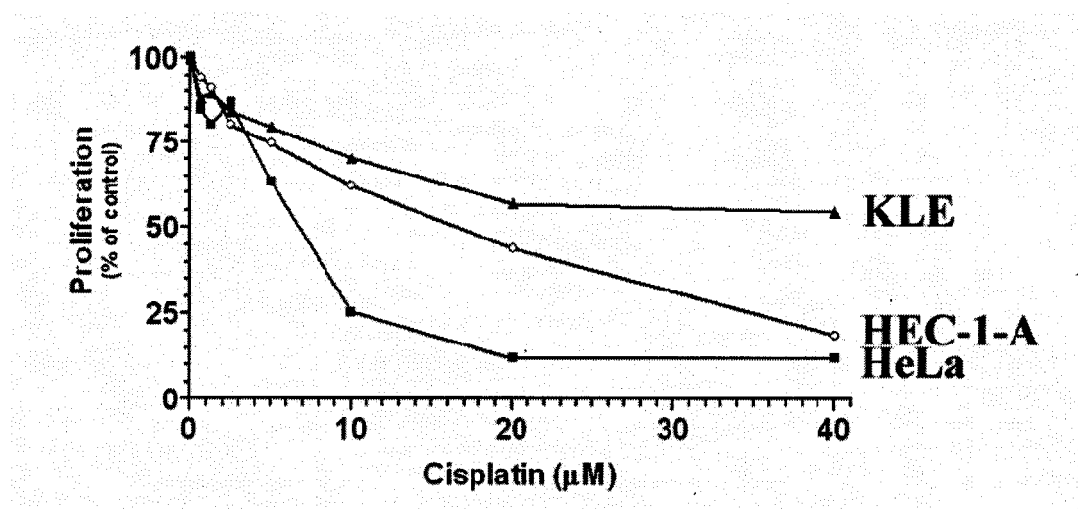


FIGURE 6 Influence of cisplatin on cell proliferation

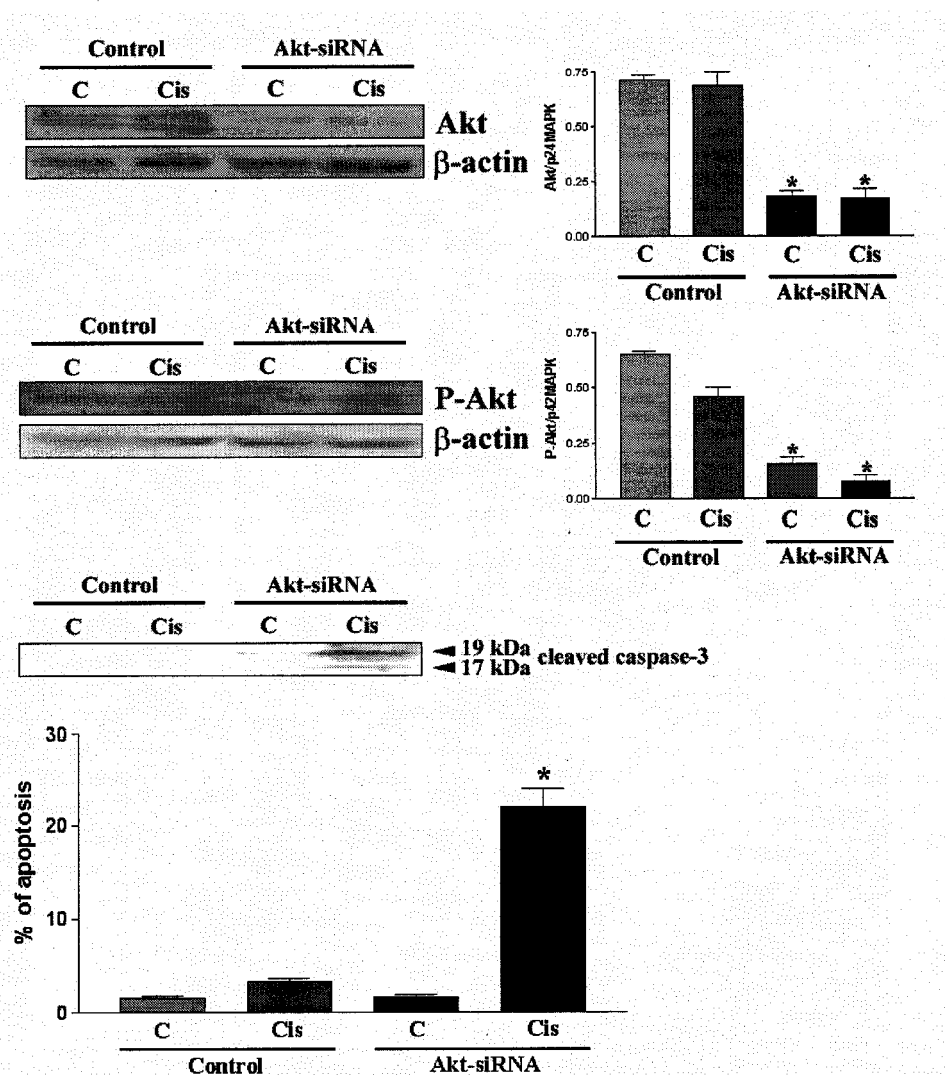


FIGURE 7 siRNA Akt down-regulation effect on cisplatin-induced apoptosis in KLE cells

CHAPITRE IV

AKT AND XIAP REGULATE THE SENSITIVITY OF HUMAN UTERINE CANCER CELLS TO CISPLATIN, DOXORUBICIN AND TAXOL

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre IV sont : Véronique Gagnon (fait les expériences, écriture de l'article), Céline Van Themsche (fait les expériences d'immunofluorescence et la démonstration que Akt et XIAP sont en relation), Steve Turner (fait les transfections combinées avec le taxol), Valérie Leblanc (fait une partie des westerns blots), et Eric Asselin, superviseur de la thèse (correction de l'article).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

L'objectif de cette étude est de déterminer l'implication possible de la protéine Akt et XIAP lors de la résistance au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol chez les cellules du cancer de l'endomètre humain. Pour ce faire, nous avons utilisé une lignée du cancer du col de l'utérus (HeLa) et une lignée du cancer de l'endomètre (KLE) reconnues pour avoir la protéine PTEN sauvage et une lignée du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN mutée (Ishikawa). Les résultats démontrent que le cisplatine, la doxorubicine et le taxol induisent l'apoptose chez les cellules HeLa et Ishikawa, mais que les cellules KLE exprimant de hauts niveaux de la forme active de la protéine Akt demeurent résistantes à ces trois agents chimiothérapeutiques. Il est important de noter que chez les cellules HeLa, l'expression de la protéine XIAP est diminuée à la suite des traitements avec les trois drogues, tandis que cet effet n'est pas observé chez les cellules exprimant P-Akt (KLE). De plus, l'utilisation de vecteurs d'expression permettant d'exprimer la protéine Akt1, Akt2 et Akt3 de façon constitutive n'a aucun effet au niveau de la sensibilité des cellules HeLa au cisplatine, mais diminue l'apoptose induite par le taxol chez ces mêmes cellules. De plus, nous démontrons pour la première fois que l'augmentation de P-Akt2 et P-Akt3 diminue l'efficacité de la doxorubicine, tandis que l'augmentation de P-Akt1 ne démontre aucun effet au niveau de la résistance à la doxorubicine. L'étude par immunofluorescence à l'aide de coupes de tissus du cancer de l'endomètre révèle que la phosphorylation de Akt est présente chez les tissus de l'endomètre sain, de même que lors d'un grade I et II de la maladie. Cependant, P-Akt est absent du grade III du cancer de l'endomètre. Enfin, une diminution des niveaux de la protéine XIAP à l'aide de la technique siRNA augmente la sensibilité des cellules KLE au cisplatine, résultant en une induction significative de la mort cellulaire. De plus, il est important de noter que le traitement avec un siRNA XIAP combiné avec le taxol induit la phosphorylation de l'isoforme Akt2. En conclusion, ces résultats démontrent pour la première fois que la protéine XIAP semble être impliquée dans la résistance au cisplatine et à la doxorubicine chez les cellules du cancer de l'endomètre, tandis que la résistance au taxol semble plutôt être causée par l'activation de Akt, telle que Akt2 et Akt3, chez ce type de cancer.

**AKT AND XIAP REGULATE THE SENSITIVITY OF HUMAN UTERINE
CANCER CELLS TO CISPLATIN, DOXORUBICIN AND TAXOL**

Véronique Gagnon, Céline Van Themsche, Steve Turner, Valérie Leblanc and Eric
Asselin*

From the department of Chemistry Biology, Université du Québec à Trois-Rivières,
Trois-Rivières, Québec, Canada, G9A 5H7

* Corresponding Author: Eric Asselin, PhD.

Department of Chemistry and Biology

Medical Biology Section

University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500

Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7

E-mail : Eric.Asselin@uqtr.ca

Abbreviated title: Akt and XIAP in chemoresistance

Acknowledgements: The authors want to thank Mrs Sophie Parent for technical assistance. This work has been supported by a grant from CIHR (MOP-66987). Eric Asselin is holder of a New Investigator award of the Canadian Institute of Health Research of Canada (CIHR) and Chairholder of the Canada Research Chair in Molecular Gyneco-Oncology.

ABSTRACT

We have investigated the interrelationship between two anti-apoptotic factors, XIAP and Akt, and their role in chemoresistance of uterine cancer cells. We used one cervical cancer cell line (HeLa) and two endometrial cancer cell lines (KLE and Ishikawa) as a model. The three drugs decreased Akt and XIAP content and induced apoptosis in P-Akt-negative HeLa cells; in P-Akt1/3-positive Ishikawa cells apoptosis induction correlated with XIAP decrease; P-Akt1/2/3 positive KLE cells showed maximum chemoresistance as XIAP and Akt levels/phosphorylation remained stable in response to the three drugs, and only cisplatin could significantly induce apoptosis. We found that XIAP and Akt were functionally linked in uterine cancer cells, as XIAP RNAi decreased P-Akt levels, and inhibition of PI3-K/Akt activity using LY294002 decreased XIAP content. Overexpression of constitutively active Akt isoforms in HeLa cells induced isoform-specific sensitivity to doxorubicin and taxol but not cisplatin. XIAP RNAi increased the cell-specific sensitivity to cisplatin and doxorubicin but not taxol. Finally, we found P-Akt immunoreactivity in epithelial cells from multiple human endometrial carcinoma tumors, suggesting that Akt may also regulate chemosensitivity in uterine cancers *in vivo*. Altogether these results highlight an intertwined role for specific Akt isoforms and XIAP in chemoresistance of uterine cancer cells.

INTRODUCTION

Pathogenesis of uterine cancers, including endometrial and cervical cancers, involves early dysregulation of apoptosis (Arends et Wyllie 1991), and uterine tumors are often refractive to current chemotherapeutic agents. To circumvent the problem of chemoresistance, the underlying anti-apoptotic mechanisms need to be identified.

Akt (protein kinase B) is a serine-threonine kinase that promotes cellular survival. Three isoforms of Akt have been identified in mammalian cells (Coffer et Woodgett 1991; Jones et al. 1991; Nakatani et al. 1999). All isoforms are activated by growth factors in a phosphatidylinositol 3-OH-kinase-dependent manner (Bellacosa et al. 1991; Cheng et al. 1992; Nakatani et al. 1999). Full activation of Akt requires its phosphorylation at two sites, one within the activation loop (T308 (Akt1), T308 (Akt2) and T309 (Akt3)), and one within the C-terminus (S473 (Akt1), S474 (Akt2) and S472 (Akt3)) (Datta et al. 1999). Although the sequence homology between Akt isoforms is >85% (Cheng et al. 1992; Nakatani et al. 1999), they differ in terms of biological and physiological functions (Cho et al. 2001b; Cho et al. 2001a). Mice lacking Akt1 demonstrate increased perinatal mortality and reduction in body weight of 20 to 30% (Chen et al. 2001; Cho et al. 2001b). In contrast, Akt2-deficient mice are born in expected Mendelian ratio and display normal growth, but they exhibit a diabetes-like syndrome with elevated fasting plasma glucose level, elevated hepatic glucose output, and perinatal insulin resistance (Cho et al. 2001a). Akt3-deficient mice exhibit a reduction in brain weight resulting from decrease in both cell size and cell number but maintain normal glucose homeostasis and body weight (Easton et al. 2005). We have previously showed that simultaneous down-regulation of Akt1 and Akt2 restores cisplatin-induced apoptosis in resistant endometrial cancer cells (Gagnon et al. 2004), but the role of individual Akt isoforms in resistance to chemotherapeutic agents in these cells is unknown.

The IAPs are a family of six intracellular anti-apoptotic proteins, including X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) (Uren et al. 1996). XIAP is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 (Takahashi et al. 1998), and modulates the Bax/cytochrome c

pathway by inhibiting caspase-9 (Deveraux et al. 1998; Deveraux et al. 1999). We have recently observed that silencing of XIAP by RNA interference sensitizes endometrial carcinoma cells to the pro-apoptotic effect of TGF- β 3 (Van Themsche et al. 2007) and thus, XIAP levels may dictate the resistance of uterine cancer cells to pro-apoptotic molecules. Cisplatin sensitivity in other types of cancer cells has been shown to involve XIAP (Asselin et al. 2001; Li et al. 2000), and we thus hypothesized that XIAP could also regulate sensitivity to chemotherapeutic agents in uterine cancer cells.

There is strong evidence for a functional relationship between Akt and XIAP in cancer cells: XIAP expression is regulated by PI 3-K and Akt activity in cancer cells (Deeb et al. 2007; Liu et al. 2006), and we have shown that PI 3-K activity regulates the levels of XIAP in endometrial cancer cells treated with TGF- β 3 (Van Themsche et al. 2007). In addition, phosphorylation of XIAP by Akt has been shown to protect XIAP from ubiquitination and degradation in response to cisplatin in cancer cells (Dan et al. 2004), and reciprocally overexpression of XIAP increases Akt phosphorylation (Asselin et al. 2001). In the present study, we have investigated the presence of a functional link between Akt and XIAP in uterine cancer cells, and the role of XIAP and individual Akt isoforms in the resistance of uterine cancer cells to three chemotherapeutic drugs, cisplatin, doxorubicin and taxol.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), cisplatin and Hoechst 33258 were obtained from Sigma (St-Louis, MO). LY294002 was from Cell Signalling Technology (Beverly, MA). Doxorubicin was a gift from Farmitalia Carlo Erba (Milan, Italy). Taxol was purchased from Acros Organics N.V. (Fair Lawn, NJ). DMEM-F12, BGS and FBS serums were obtained from HyClone (South Logan, Utah). All antibodies were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), except for anti-Akt3/PKBy (Upstate cell signaling solutions, Lake Placid, NY), and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse secondary antibodies (Mississauga, ON, Canada). Immunoprecipitation kit (Protein A) was

purchased from Roche (Laval, QC). Constitutively active (CA) Akt1 vector was generously provided by Dr Zhenguo Wu (Hong Kong University of Science and Technology, Kowloon, Hong Kong). Constitutively active (CA) Akt2 vector was generously provided by Dr Joseph R. Testa (Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA). XIAP siRNA was obtained from Invitrogen (Burlington, ON). Human endometrial carcinoma tissue section slides were purchased from Cybrdi (Frederick, MD).

Cell culture. Human endometrial cancer cells KLE were obtained from ATCC. Ishikawa cells were generously provided by Dr Sylvie Mader (Université de Montréal, Qc, Canada) and HeLa cells were a kind gift from Dr Michel Vincent (Université Laval, Qc, Canada). HeLa and Ishikawa cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with HEPES, BGS (2%) and gentamycin (50 µg/mL). KLE cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with FBS (10%) and gentamycin (50 µg/mL).

MTT proliferation assay. Cells were plated at a density of 1.5×10^4 cells/ well (HeLa and KLE) and 2×10^4 cells/ well (Ishikawa) in 96-well plates 24 h before the assay. Cells were cultured for 48 h in the presence of different concentrations of cisplatin, doxorubicin and taxol in a total volume of 100 µL per well. After 44 hours of incubation, 10 µL of MTT (5 mg/ml) was added to each well. After 4 h of incubation with MTT, 100 µL of solubilization solution (10% SDS in 0.01 M HCl) was added and the microplate was incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The OD was read with Fluostar OPTIMA BMG (BMG LABTECH inc., Durham, NC) at 550 nm.

Protein extraction and Western analysis. Cells were trypsinized, lysed in RIPA lysis buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, protease complete inhibitor; Roche), frozen and thawed three times, then centrifuged (13000 X g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 µg) were heated (95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semidry transfer apparatus (Bio-Rad, Mississauga, ON).

The membranes were then blocked (2 h, RT) with PBS containing 5% milk powder and Tween 0.05%, then incubated with anti-Akt1 (1:5000), anti-Akt2 (1:2000), anti-Akt3 (1:1500), anti-human P-Akt (1:1500), anti-cleaved caspase-3 (1:1500), anti-cleaved PARP (1:2000) and anti-XIAP (1:2000) antibody (overnight, 4°C), and subsequently with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3000) or anti-mouse secondary antibody (1:2000) (RT, 45 min). Peroxidase activity was visualized with the Super signal® West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions.

Immunoprecipitation. Akt1, Akt2 and Akt3 proteins were immunoprecipitated using Immunoprecipitation Kit (Protein A) according to manufacturer's instructions. Briefly, KLE cells were trypsinized and lysed in RIPA lysis buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, protease complete inhibitor; Roche). Lysate was transferred to a syringe pre-chilled on ice and homogenized 10 times. To remove debris, the homogenized suspension was centrifuged 10 min at 4°C. Protein A-agarose bead suspension was added to supernatant and incubated for at least 3 h at 4°C on a rocking platform. Pre-cleared lysate was centrifuged and specific antibody (Akt1 1:500, Akt2 1:200, Akt3 1:200) was added to supernatant and gently rocked for 1 h at 4°C. 50 µL of the protein A suspension was added to the prepared samples and incubated overnight at 4°C on a rocking platform. Complexes were collected by centrifugation and supernatant was washed three times with buffer, twice with buffer 2 and once with buffer 3. Reducing sample buffer was added to the complexes and the suspension was boiled 3 min at 100°C, centrifuged to pellet the agarose beads and the supernatant was collected for western blot analysis.

CA-Akt3 plasmid constructs. Polymerase chain reaction was employed to construct constitutively active (CA) human Akt3 expression vector. Human Akt3 mRNA was amplified using sense primer 5'-CTCAGAGGGGAGTCATCATGAGCGATGTTACC-3' and antisense primer 5'-AGAATGAAAGAGACTTATTCTCGTCCACTTGC-3'. Moreover, in 5' of the sense and antisense primer, a sequence for the restriction enzymes Xba I and BamH I respectively were included. Absence of mutation was confirmed by

sequencing in both directions. pUSEamp vector containing N-terminal myristoylation sequence (Upstate, Lake Placid, NY) and Akt3 PCR product were cut with BamH I and Xba I, and ligated with T4 DNA Ligase (New England, Biolabs Mississauga, ON). At the end, new plasmid containing Akt3 mRNA and myristoylation sequence was cut with Hind III and BamH1, and CA-Akt3 sequence was cloned into pcDNA3.1/V5-His TOPO TA expression vector (Invitrogen, Burlington, ON).

Transfections of plasmid constructs. HeLa cells were plated at a density of 2×10^6 cells in 100 mm x 20 mm dish 24 h before transfection. Transient transfection of the cells was carried out with 5 µg of constitutively active (CA) Akt1, Akt2 or Akt3 expression vector/dish using Superfect reagent (Qiagen, Mississauga, ON), according to the protocol suggested by the manufacturer. Empty vector was used as the transfection control.

XIAP siRNA. KLE and Ishikawa cells were plated for 24 h to reach approximately 70% confluency, and were transfected for 24 h with 100 nM XIAP siRNA or control (scrambled) siRNA using Trans-it TKO reagent (Mirus, Mississauga, Ont, Canada) according to manufacturer's instruction.

Hoechst nuclear staining. Following treatment, both floating and attached cells were resuspended in 10% formalin containing 10 µg/mL Hoechst 33258 for 24 h at 4°C. Hoechst nuclear staining was viewed using Olympus BX60 fluorescence microscope. Cells with typical apoptotic nuclear morphology (nuclear shrinkage, condensation and fragmentation) were identified and counted using randomly selected fields on numbered photographic slides, of which the "counter" was not aware of the treatment so as to avoid experimental bias. A minimum of 200 cells per treatment group was counted in each experiment.

Immunofluorescence staining. Human endometrial carcinoma tissue section slides containing 60 endometrial carcinoma tissues and 3 normal endometrial specimens, were used. The tissues obtained from biopsies were already formalin-fixed, paraffin-embedded. Slides were deparaffinized by heating at 60°C for 30 minutes followed by two washes in NeoClear solvent and progressively hydrated with successive washes at

room temperature in 100% ethanol, 95% ethanol in PBS, 70% ethanol in PBS and finally PBS. After permeabilization for 6 min in boiling citrate solution (0.1 % sodium citrate, 0.1% Triton X-100 in water), tissue slides were washed twice in PBS at room temperature. Non-specific binding sites were blocked by 1-hour incubation with goat serum at room temperature in a humidified chamber, and tissues were probed with rabbit anti-human P-Akt primary antibody overnight at 4°C. Slides were washed twice in PBS, and tissues were probed with Alexa Fluor 488-conjugated anti-rabbit secondary antibody for 1 hour at room temperature in a humidified chamber protected from light. Slides were washed once in PBS and counterstained with Hoechst nuclear dye followed by two rinses in water. Tissues were covered with ProlongTM anti-fade mounting medium (Invitrogen) and observed under a fluorescence microscope.

Statistical analysis. All experiments were repeated a minimum of three times. Data were subjected to one-way ANOVA (PRISM software version 4.0; GraphPad, San Diego, CA). Differences between experimental groups were determined by the Tukey's test.

RESULTS

Uterine cancer cells show differential sensitivity to chemotherapeutic drugs. We have examined the ability of chemotherapeutic drugs cisplatin, doxorubicin and taxol to induce apoptosis in three model uterine cancer cell lines, HeLa, KLE, and Ishikawa. The three drugs dose-dependently suppressed the growth (Fig. 1D-F), induced caspase-9, caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 1G,I) and induced apoptosis in HeLa (Fig. 1A) and Ishikawa (Fig. 1C) cells. KLE cells were modestly growth-inhibited by cisplatin (Fig. 1D) and doxorubicin (Fig. 1E), and although both drugs induced the cleavage of caspase-9, caspase-3 and PARP (Fig. 1H), only cisplatin could significantly induce apoptosis in these cells (Fig. 1B). Taxol did not suppress the growth of KLE cells (Fig. 1F), and although it induced caspase-9 and caspase-3 cleavage, downstream cleavage of PARP was absent (Fig. 1H) and apoptosis was not induced (Fig. 1B).

Akt and XIAP are functionally related in uterine cancer cells. We have determined whether the two anti-apoptotic factor Akt and XIAP, which we hypothesized to be both involved in the resistance of uterine cancer cells to apoptotic drugs, were functionally linked in these cells, similar to other cancer cell types (Asselin et al. 2001; Liu et al. 2006). Indeed we found that silencing of XIAP using RNAi reduced P-Akt levels in KLE and Ishikawa cells (Fig. 2A), indicating that XIAP can regulate Akt phosphorylation/activity; reciprocally we also observed that inhibition of PI-3K activity and of downstream phosphorylation of Akt in Ishikawa cells reduced XIAP levels (Fig. 2A), indicating that PI 3-K/Akt pathway activity regulates XIAP in these cells. In the course of these experiments we observed that anti-Akt and P-Akt antibodies recognize two distinct bands in KLE cell lysate: immunoprecipitation experiments showed that Akt1 and Akt3 form the upper band, while Akt2 appears in the lower band (Fig. 2B). These immunoprecipitation experiments have allowed us to determine that each Akt isoform was constitutively phosphorylated in resistant KLE cells (Fig. 2B), while Ishikawa cell lysate contained constitutively phosphorylated Akt1 and Akt3 isoforms, and HeLa cell extract contained Akt1 and Akt2 isoforms which were not constitutively phosphorylated (data not shown).

Chemotherapeutic drugs decrease Akt and XIAP content in P-Akt negative cells. We have compared the regulation of anti-apoptotic factors Akt and XIAP between drug-sensitive cells (HeLa and Ishikawa) and doxorubicin and taxol-resistant cells (KLE). We found that cisplatin, doxorubicin and taxol similarly reduced Akt levels in P-Akt negative HeLa cells (Fig. 2C). The levels of each Akt isoform, as well as their phosphorylation status, remained unchanged in response to the three drugs in P-Akt-positive KLE cells (Fig. 2D) and Ishikawa cells (Fig. 2E), except for taxol which selectively increased Akt2 phosphorylation in KLE cells (Fig. 2D). Similarly, we found that XIAP levels were reduced by each drug in P-Akt negative HeLa cells (Fig. 2C), but remained stable in P-Akt positive KLE and Ishikawa cells (Fig. 2D,E), except for doxorubicin which decreased XIAP content in Ishikawa cells (Fig. 2E).

Specific Akt isoforms can regulate the sensitivity of uterine cancer cells to selective chemotherapeutic drugs. To determine the role of each Akt isoform in the resistance to chemotherapeutic drugs in uterine cancer cells, gain-of-function experiments were conducted by overexpressing constitutively active (CA) Akt isoforms before treatment with chemotherapeutic drugs (Fig. 3A-C). We found that cisplatin reduced the constitutive phosphorylation of Akt transgenes (Fig. 3A-C), and that overexpression of each Akt isoform did not reduce caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 3A-C), nor the extent of apoptosis (Fig. 3D) induced by cisplatin in HeLa cells. These results suggest that overexpression of individual Akt isoforms does not confer resistance to cisplatin-induced apoptosis in uterine cancer cells. CA-Akt1 transfection prior to doxorubicin treatment did not significantly decrease doxorubicin-induced caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 4A-C) nor induction of apoptosis (Fig. 4D), but transfection of HeLa cells with CA-Akt2 or CA-Akt3 decreased doxorubicin-induced cleavage of caspase-3 and PARP (Fig. 4B,C) and apoptosis (Fig. 4D). This suggests that Akt2 and Akt3 can protect uterine cancer cells from doxorubicin-induced apoptosis. Finally, overexpression of each constitutively active Akt isoform decreased taxol-induced caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 5A-C) and significantly reduced taxol-induced apoptosis (Fig. 5D); this was associated with the inability of taxol to significantly reduce the phosphorylation of Akt transgenes (Fig. 5A-C). This suggests that each Akt isoform can increase the resistance to taxol-induced apoptosis in uterine cancer cells.

XIAP protects uterine cancer cells from drug-induced apoptosis. To determine the role of XIAP in the resistance of endometrial cancer cells to chemotherapeutic drugs, loss-of-function experiments involving XIAP RNAi were conducted. XIAP RNAi significantly increased basal apoptotic index in KLE cells (Fig. 6C), showing a role for XIAP in basal cell survival. In these cells, the extent of caspase-3 and PARP cleavage (Fig. 6A) as well as the apoptotic index (Fig. 6C) induced by cisplatin following XIAP RNAi were significantly higher than combined effects of cisplatin alone and XIAP knockdown alone, showing a role for XIAP in resistance to cisplatin in this cell line. XIAP RNAi did not potentiate doxorubicin- or taxol-induced apoptosis (Fig. 6C) in KLE cells. In Ishikawa cells, silencing of XIAP did not increase cisplatin-induced cleavage of caspase-3 and PARP (Fig. 6B) or

cisplatin-induced apoptosis (Fig. 6D), but it increased doxorubicin-induced cleavage of caspase-3 and PARP (Fig. 6B) and apoptosis (Fig. 6D). Collectively, these results indicate that XIAP can protect uterine cancer cells from specific anticancer drugs.

Akt is phosphorylated in human endometrial carcinoma cells *in vivo*. We have determined the phosphorylation status of Akt throughout human endometrial carcinoma progression: immunofluorescence experiments showed that the active form of Akt is present in epithelial cells from normal endometrial tissues (Fig. 7D) as well as from grade I (Fig. 7A) and II (Fig. 7B) endometrial carcinoma tumors. Phosphorylation of Akt was almost undetectable in grade III tumors (Fig. 7C). Akt would therefore be phosphorylated/active throughout cancer progression in human endometrial carcinoma cells, except in late-stage tumors.

DISCUSSION

Cellular resistance to chemotherapeutic agents limits the success of anticancer therapies; the identification of factors responsible for chemoresistance will help to design more effective treatments. In the present study, we have investigated the interrelationship between two anti-apoptotic factors, Akt and XIAP, in uterine cancer cells, and their regulation and role in the context of cellular resistance to cisplatin, doxorubicin and taxol.

KLE endometrial adenocarcinoma cell line constitutes an excellent model to study the mechanisms involved in chemoresistance: we had previously reported that these cells were highly resistant to cisplatin (Gagnon et al. 2004), and now we describe how these cells show complete resistance to doxorubicin and taxol. We have compared the pro-apoptotic mechanisms activated by chemotherapeutic drugs in resistant KLE cells and in sensitive Ishikawa endometrial carcinoma cells and HeLa cervical cancer cells. We found that caspase signaling is activated in sensitive as well as resistant cell lines, and the presence of cleaved fragments of caspase-9 in treated cells demonstrates that each

drug activates the mitochondrial (intrinsic) pathway in uterine cancer cells, similar to other cancer cell types (Alexia et al. 2006; Li et al. 2005; Yang et al. 2006). However, in resistant KLE cells, only cisplatin could induce the cleavage of caspase-3 substrate PARP, strongly suggesting that caspase-3 activity was inhibited in these cells. XIAP has been shown to interact with and inhibit caspase-3 activity (Takahashi et al. 1998), and we found that in KLE cells, XIAP content was only decreased by cisplatin, and not by doxorubin and taxol which were unable to induce apoptosis in this cell line. Similarly, in Ishikawa cells, the extent of decrease of XIAP content was positively correlated with the efficiency of drug-induced apoptosis. Moreover, we showed that XIAP knockdown by RNAi sensitized KLE cells and Ishikawa cells to drug-induced apoptosis. Collectively our results demonstrate that XIAP is targeted by chemotherapeutic drugs and plays a key role in the inhibition of drug-induced apoptosis in uterine cancer cells. We recently reported that XIAP regulates the sensitivity of endometrial carcinoma cell lines to TGF- β -induced apoptosis (Van Themsche et al. 2007); in other types of cancer cells, XIAP has been shown to be involved in the resistance to death receptors-activating agents, such as TRAIL (Lippa et al. 2007). Importantly, we have showed that XIAP is expressed by human endometrial cancer cells *in vivo* (Van Themsche et al. 2007), and therefore XIAP may play its protective role against anticancer drugs *in vivo*. Interestingly, the protective role of XIAP in uterine cancer cells was drug-specific, as KLE cells were sensitized to cisplatin-induced apoptosis, while Ishikawa were sensitized to doxorubicin-induced apoptosis; in addition XIAP could not protect uterine cancer cells against taxol-induced apoptosis. This may be related to the different mode of action of the three anticancer drugs: indeed, cisplatin inhibits replication by forming cisplatin-DNA adducts causing G₁ arrest (Un 2007); doxorubicin inhibits replication by acting on topoisomerase II complex (Gewirtz 1999) and generates free radicals and hydrogen peroxyde which activate mitochondria-induced apoptosis (Mizutani et al. 2005); taxol inhibits cell replication by disrupting normal mitotic spindle formation (Schiff et Horwitz 1980). Therefore, in addition to XIAP, other cellular factors may be regulated by these drug-specific molecular mechanisms that provide selective cellular responses to the drugs.

In our search for such factors, we found that Akt and XIAP are functionally related in uterine cancer cells under basal conditions; indeed, down-regulation of XIAP using RNAi induces a decrease of P-Akt content, and reciprocally inhibition of PI-3 K-regulated Akt phosphorylation triggers a decrease of XIAP content. This link between XIAP and Akt can also be observed when the cells are exposed to chemotherapeutic drugs: it has recently been demonstrated that Akt directly interacts with and phosphorylates XIAP, leading to inhibition of cisplatin-induced ubiquitination and degradation (Dan et al. 2004). Thus, in the absence of active Akt to stabilize the protein, drugs can more readily induce the degradation of protective factor XIAP. In accordance, we observed that in P-Akt negative HeLa cells, XIAP levels were almost completely decreased by cisplatin, doxorubicin and taxol, whereas in P-Akt positive KLE and Ishikawa cells, sustained P-Akt levels following drug exposure were associated with sustained XIAP levels. Interestingly, doxorubicin decreased XIAP content in Ishikawa cells even though P-Akt levels were maintained. This may be explained by the fact that Ishikawa cells, contrarily to KLE cells, do not contain detectable levels of P-Akt2: indeed, overexpression of constitutively active Akt2 in HeLa cells was sufficient to decrease doxorubicin-induced apoptosis, whereas overexpression of Akt1 was not. This shows how Akt-induced protection from drug-induced apoptosis is isoform-specific. Others had reported that targeting of Akt decreases resistance to doxorubicin in cancer cells (Clark et al. 2002; Shi et al. 2005), but we showed for the first time that specific Akt isoforms have distinct impact. We also observed that intrinsic resistance to taxol-induced apoptosis in KLE cells was accompanied by an increase of Akt2 phosphorylation, suggesting a specific role for Akt2 activity in resistance to taxol. This hypothesis is supported by our observation that HeLa cells and Ishikawa cells, in which Akt2 is absent (Ishikawa) or not phosphorylated even in response to taxol (HeLa), taxol efficiently triggers apoptosis. Moreover, overexpression of constitutively active Akt2 in HeLa cells conferred resistance to taxol-induced apoptosis. Others have provided evidence that Akt2 could confer cancer cells with resistance to taxol, as Akt2 has been shown to mediate Twist-induced paclitaxel resistance in breast cancer cells (Cheng et al. 2007). In addition, a role for Akt2 in XIAP stabilization and chemoresistance has been described by Dan and coworkers, who showed that XIAP mediates Akt2-dependent

protection of ovarian cancer cells from cisplatin-induced apoptosis (Dan et al. 2004). Protection from cisplatin-induced apoptosis by Akt2 appears to be cell-specific, as overexpression of constitutively active Akt2 did not modulate the extent of cisplatin-induced apoptosis in HeLa cells. In fact, overexpression of each constitutively active Akt isoform failed to protect HeLa cells from cisplatin-induced apoptosis. We had previously reported that simultaneous down-regulation of two distinct Akt isoforms (Akt1 and Akt2) increased cisplatin-induced apoptosis in endometrial carcinoma cells (Gagnon et al. 2004); in the present model, it may therefore be necessary to overexpress multiple Akt isoforms simultaneously to confer resistance to cisplatin in HeLa cells.

Altogether, our results identify XIAP and Akt as two anti-apoptotic factors that can protect from drug-induced apoptosis and which are targeted by anticancer agents. It is well established that pro-apoptotic agents induce a decrease in XIAP protein levels by inducing its ubiquitination and degradation in the proteasome (Dan et al. 2004). Similarly, pro-apoptotic signals can induce Akt ubiquitination and degradation (Medina et al. 2005), but degradation of Akt protein may occur through an additional mechanism, as Akt has been shown to be a direct substrate for caspase-3 (Asselin et al. 2001). In fact, whenever caspase-3 activity is not opposed by XIAP or other inhibitors such as cIAP-1 or cIAP-2 (Roy et al. 1997), pro-apoptotic signals triggering caspase-3 activity can induce Akt cleavage. In accordance, we found that total Akt levels are decreased only when XIAP is almost totally degraded. In Ishikawa cells after treatment with doxorubicin, Akt levels are stable even though XIAP levels are reduced, but it is possible that remaining XIAP levels are sufficient to counteract caspase-3 activity.

Finally, we have showed that Akt is present and active in tumor cells throughout endometrial cancer progression, suggesting that Akt activity may also confer chemoprotection *in vivo*. However, we could not detect P-Akt immunoreactivity in late-stage tumors, suggesting that endometrial tumor cells evolve to ultimately overcome the need for Akt activity. In contradiction with this result, it has recently been reported that grade III endometrial cancer had high P-Akt content (Rice et al. 2006); however, the same study showed decreased estrogen receptor α (ER α) protein levels in the tissues

(Rice et al. 2006). It is established that estradiol regulates Akt phosphorylation in human (Guzeloglu et al. 2004) and rat (Dery et al. 2003) endometrial cells, and P-Akt levels were previously showed to correlate with ER α protein levels in endometrial tumors (Rice et al. 2006). We did not conduct immunofluorescence analysis of ER α in addition to P-Akt, but we had previously showed that XIAP levels were decreased in late-stage endometrial tumors, in agreement with a positive relationship between P-Akt and XIAP in endometrial cancer cells. Further experiments will thus be required to clarify the regulation of Akt phosphorylation during late-stage endometrial carcinoma. In the meantime, it may be remembered that in early and middle-stage endometrial tumors, Akt is present and active and could be evaluated as a target to increase the sensitivity of anticancer agents. To this aim, considering the relationship between P-Akt and XIAP, two strategies can be envisaged: either directly targeting Akt, or indirectly targeting XIAP. If our *in vitro* results are representative of the *in vivo* situation, both strategies should simultaneously decrease P-Akt and XIAP in tumor cells and double the benefit for the patients.

In this study, we describe how Akt and XIAP are two important anti-apoptotic factors that are functionally related in uterine cancer cells. We show that XIAP levels regulate the sensitivity to cisplatin or doxorubicin in a cell-specific manner, but not to taxol. In addition, we show that similar to XIAP, Akt can protect uterine cancer cells from drug-induced apoptosis; Akt isoforms have a distinct impact in cellular resistance to a given drug, and Akt activity does not confer equal resistance to the different chemotherapeutic agents. Finally, we demonstrate that Akt is present and active in human uterine cancer cells throughout cancer progression, except in late-stage tumors and therefore, Akt is likely to play a role in the resistance to anticancer drugs *in vivo*.

REFERENCES

- Alexia, C., Bras, M., Fallot, G., Vadrot, N., Daniel, F., Lasfer, M., Tamouza, H., and Groyer, A. "Pleiotropic effects of PI-3' kinase/Akt signaling in human hepatoma cell proliferation and drug-induced apoptosis", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1090:1-17., 1-17, (2006).
- Arends, M. J. and Wyllie, A. H. "Apoptosis: mechanisms and roles in pathology", *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254, (1991).
- Asselin, E., Mills, G. B., and Tsang, B. K. "XIAP regulates Akt activity and Caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.", *Cancer Res.* 61, 1862-1868, (2001).
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., and Tsichlis, P. N. "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region", *Science* 254, 5029: 274-277, (1991).
- Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T., and Hay, N. "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene", *Genes Dev.* 15, 17: 2203-2208, (2001).
- Cheng, G. Z., Chan, J., Wang, Q., Zhang, W., Sun, C. D., and Wang, L. H. "Twist transcriptionally up-regulates Akt2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel", *Cancer Res.* 67, 5: 1979-1987, (2007).
- Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsichlis, P. N., and Testa, J. R. "Akt2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 19: 9267-9271, (1992).
- Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., III, Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., and Birnbaum, M. J. "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)", *Science* 292, 5522: 1728-1731, (2001a).
- Cho, H., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Feng, F., and Birnbaum, M. J. "Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice", *J. Biol. Chem.* 276, 42: 38349-38352, (2001b).
- Clark, A. S., West, K., Streicher, S., and Dennis, P. A. "Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells", *Mol. Cancer Ther.* 1, 9: 707-717, (2002).

- Coffer, P. J. and Woodgett, J. R. "Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families", *Eur. J. Biochem.* 201, 2: 475-481, (1991).
- Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Wang, H. G., Tsang, B. K., and Cheng, J. Q. "Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)", *J. Biol. Chem.* 279, 7: 5405-5412, (2004).
- Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. "Cellular survival: a play in three Akts", *Genes Dev.* 13, 22: 2905-2927, (1999).
- Deeb, D., Jiang, H., Gao, X., Al Holou, S., Danyluk, A. L., Dulchavsky, S. A., and Gautam, S. C. "Curcumin [1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-6-heptadine-3,5-dione; C₂₁H₂₀O₆] sensitizes human prostate cancer cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo2L-induced apoptosis by suppressing nuclear factor-kappaB via inhibition of the prosurvival Akt signaling pathway", *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 321, 2: 616-625, (2007).
- Dery, M. C., Leblanc, V., Shooner, C., and Asselin, E. "Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle", *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 1: 47-, (2003).
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases", *EMBO J.* 18, 19: 5242-5251, (1999).
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van, Arsdale T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.", *EMBO J.* 17, 8: 2215-2223, (1998).
- Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., Lee, V. M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., and Birnbaum, M. J. "Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size", *Mol. Cell Biol.* 25, 5: 1869-1878, (2005).
- Gagnon, V., Mathieu, I., Sexton, E., Leblanc, K., and Asselin, E. "AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells", *Gynecol. Oncol.* 94, 3: 785-795, (2004).
- Gewirtz, D. A. "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", *Biochem. Pharmacol.* 57, 7: 727-741, (1999).
- Guzeloglu, Kayisli O., Kayisli, U. A., Luleci, G., and Arici, A. "In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent", *Biol. Reprod.* 71, 3: 714-721, (2004).

- Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F., and Hemmings, B. A. "Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 10: 4171-4175, (1991).
- Li, J., Sasaki, H., Sheng, Y. L., Schneiderman, D., Xiao, C. W., Kotsuji, F., and Tsang, B. K. "Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant?", *Biol. Signals Recept.* 9, 2: 122-130, (2000).
- Li, R., Moudgil, T., Ross, H. J., and Hu, H. M. "Apoptosis of non-small-cell lung cancer cell lines after paclitaxel treatment involves the BH3-only proapoptotic protein Bim", *Cell Death. Differ.* 12, 3: 292-303, (2005).
- Lippa, M. S., Strockbine, L. D., Le, T. T., Branstetter, D. G., Strathdee, C. A., and Holland, P. M. "Expression of anti-apoptotic factors modulates Apo2L/TRAIL resistance in colon carcinoma cells", *Apoptosis.* 12, 8: 1465-1478, (2007).
- Liu, X., Shi, Y., Giranda, V. L., and Luo, Y. "Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway sensitizes MDA-MB468 human breast cancer cells to cerulenin-induced apoptosis", *Mol. Cancer Ther.* 5, 3: 494-501, (2006).
- Medina, E. A., Afsari, R. R., Ravid, T., Castillo, S. S., Erickson, K. L., and Goldkorn, T. "Tumor necrosis factor- α decreases Akt protein levels in 3T3-L1 adipocytes via the caspase-dependent ubiquitination of Akt", *Endocrinology.* 146, 6: 2726-2735, (2005).
- Mizutani, H., Tada-Oikawa, S., Hiraku, Y., Kojima, M., and Kawanishi, S. "Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide", *Life Sci.* 76, 13: 1439-1453, (2005).
- Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D. A., Weigel, R. J., and Roth, R. A. "Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 3: 906-910, (1999).
- Rice, L. W., Stone, R. L., Xu, M., Galgano, M., Stoler, M. H., Everett, E. N., and Jazaeri, A. A. "Biologic targets for therapeutic intervention in endometrioid endometrial adenocarcinoma and malignant mixed mullerian tumors", *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 4: 1119-1128, (2006).
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases", *EMBO J.* 16, 23: 6914-6925, (1997).
- Schiff, P. B. and Horwitz, S. B. "Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 3: 1561-1565, (1980).
- Shi, Y., Liu, X., Han, E. K., Guan, R., Shoemaker, A. R., Oleksijew, A., Woods, K. W., Fisher, J. P., Klinghofer, V., Lasko, L., McGonigal, T., Li, Q., Rosenberg, S. H.,

- Giranda, V. L., and Luo, Y. "Optimal classes of chemotherapeutic agents sensitized by specific small-molecule inhibitors of akt in vitro and in vivo", *Neoplasia*. 7, 11: 992-1000, (2005).
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.", *J. Biol. Chem.* 273, 14: 7787-7790, (1998).
- Un, F. "G1 arrest induction represents a critical determinant for cisplatin cytotoxicity in G1 checkpoint-retaining human cancers", *Anticancer Drugs*. 18, 4: 411-417, (2007).
- Uren, A. G., Pakusch, M., Hawkins, C. J., Puls, K. L., and Vaux, D. L. "Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10: 4974-4978, (1996).
- Van Themsche, C., Mathieu, I., Parent, S., and Asselin, E. "Transforming growth factor-beta3 increases the invasiveness of endometrial carcinoma cells through phosphatidylinositol 3-kinase-dependent up-regulation of X-linked inhibitor of apoptosis and protein kinase c-dependent induction of matrix metalloproteinase-9", *J. Biol. Chem.* 282, 7: 4794-4802, (2007).
- Yang, X., Fraser, M., Moll, U. M., Basak, A., and Tsang, B. K. "Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway", *Cancer Res.* 66, 6: 3126-3136, (2006).

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Differential sensitivity of uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol. (A-C) Following 48 h treatment with cisplatin (10 μ M), doxorubicin (1 μ M) or taxol (5 nM), HeLa (A), KLE (B) and Ishikawa (C) cell were stained with Hoechst nuclear dye and apoptotic index was measured. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. Columns with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$). (D-F) Cells were treated for 48 h with increasing doses of (D) cisplatin (0; 0.625; 1.25; 2.5; 5; 10 and 20 μ M), (E) doxorubicin (0; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5; 1 and 2 μ M) or (F) taxol (0; 6.25; 12.5; 25; 50 and 100 nM) and MTT proliferation assays were conducted. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. (G-I) HeLa (G), KLE (H) and Ishikawa (I) cells were treated for 24 h with cisplatin (10 μ M), doxorubicin (1 μ M) or taxol (5nM), and cleavage of caspase-9, caspase-3 and PARP was monitored using western blot. β -actin was used as control to correct for loading. Results are representative of three independent experiments.

Figure 2 Chemotherapeutic drugs decrease Akt phosphorylation and XIAP content in P-Akt negative cells. (A) KLE and Ishikawa cells were transfected for 24h with 100 nM control (scrambled) or XIAP siRNA, or with increasing doses of PI 3-K inhibitor LY294002 (0, 10, 25 μ M), before P-Akt and XIAP levels were assessed using western blot. (B) Akt isoforms were immunoprecipitated in resting KLE cell extracts using isoform-specific antibodies, followed by western blot analysis of immunoprecipitated Akt isoform levels and phosphorylation. (C-E) HeLa (C), KLE (D) and Ishikawa (E) cells were treated for 48 h with cisplatin (10 μ M), doxorubicin (1 μ M) or taxol (5nM) and Akt levels and phosphorylation and XIAP content were determined by western blot analysis. β -actin was used as control to correct for loading. Results are representative of three independent experiments.

Figure 3

Overexpressing individual Akt isoforms does not increase resistance of HeLa cells to cisplatin-induced apoptosis. HeLa cells were transfected with vectors encoding constitutively active Akt1 (A), Akt2 (B) or Akt3(C) or control (empty) vector, and then treated for 24 h with cisplatin (10 μ M), followed by (A-C) western blot analysis of overexpressed Akt isoform levels and phosphorylation and cleavage of caspase-3 and PARP. β -actin was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments; or (D) staining with Hoechst nuclear dye to determine apoptotic index. Data are mean \pm SEM of six independent experiments.

Figure 4

Overexpressing constitutively active Akt2 or Akt3 increases the resistance of HeLa cells to doxorubicin-induced apoptosis. HeLa cells were transfected with vectors encoding constitutively active Akt1 (A), Akt2 (B) or Akt3(C) or control (empty) vector, and then treated for 24 h with doxorubicin (1 μ M), followed by (A-C) western blot analysis of overexpressed Akt isoform levels and phosphorylation and cleavage of caspase-3 and PARP. β -actin was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments; or (D) staining with Hoechst nuclear dye to determine apoptotic index. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. *Significantly different ($P < 0.05$).

Figure 5

Overexpressing constitutively active Akt1, Akt2 or Akt3 increases the resistance of HeLa cells to taxol-induced apoptosis. HeLa cells were transfected with vectors encoding constitutively active Akt1 (A), Akt2 (B) or Akt3(C) or control (empty) vector, and then treated for 24 h with taxol (5 nM), followed by (A-C) western blot analysis of overexpressed Akt isoform levels and phosphorylation and cleavage of caspase-3 and PARP. β -actin was used as control to correct for loading and blots are representative of three independent experiments; or (D) staining with Hoechst nuclear dye to

determine apoptotic index. Data are mean \pm SEM of four independent experiments. *Significantly different ($P < 0.05$).

Figure 6

XIAP protects uterine cancer cells from cisplatin. (A-D) KLE cells (A,C) and Ishikawa cells (B,D) were transfected with XIAP siRNA or control (scrambled) siRNA and treated for 48 h with cisplatin (10 μ M), doxorubicin (1 μ M) or taxol (5 nM), followed by western blot analysis of XIAP content, Akt isoforms levels and phosphorylation, and cleavage of caspase-3 and PARP (A,B). β -actin was used as control to correct for loading; results are representative of three independent experiments; or (C,D) staining with Hoechst nuclear dye to determine apoptotic index. Data are mean \pm SEM of three independent experiments. *Significantly different ($P < 0.05$).

Figure 7

Akt is phosphorylated in human endometrial carcinoma cells *in vivo*. Immunofluorescence staining with anti-P-Akt antibody (green) was performed on human endometrial carcinoma tissues grade I (A, 17 specimens), grade II (B, 33 specimens), grade III (C, 5 specimens), and in normal endometrial tissue (D, 3 specimens). (E) Negative staining was performed by omitting primary antibody. Nuclei were counterstained with Hoechst dye (blue). Representative results are shown. Magnification: 400X.

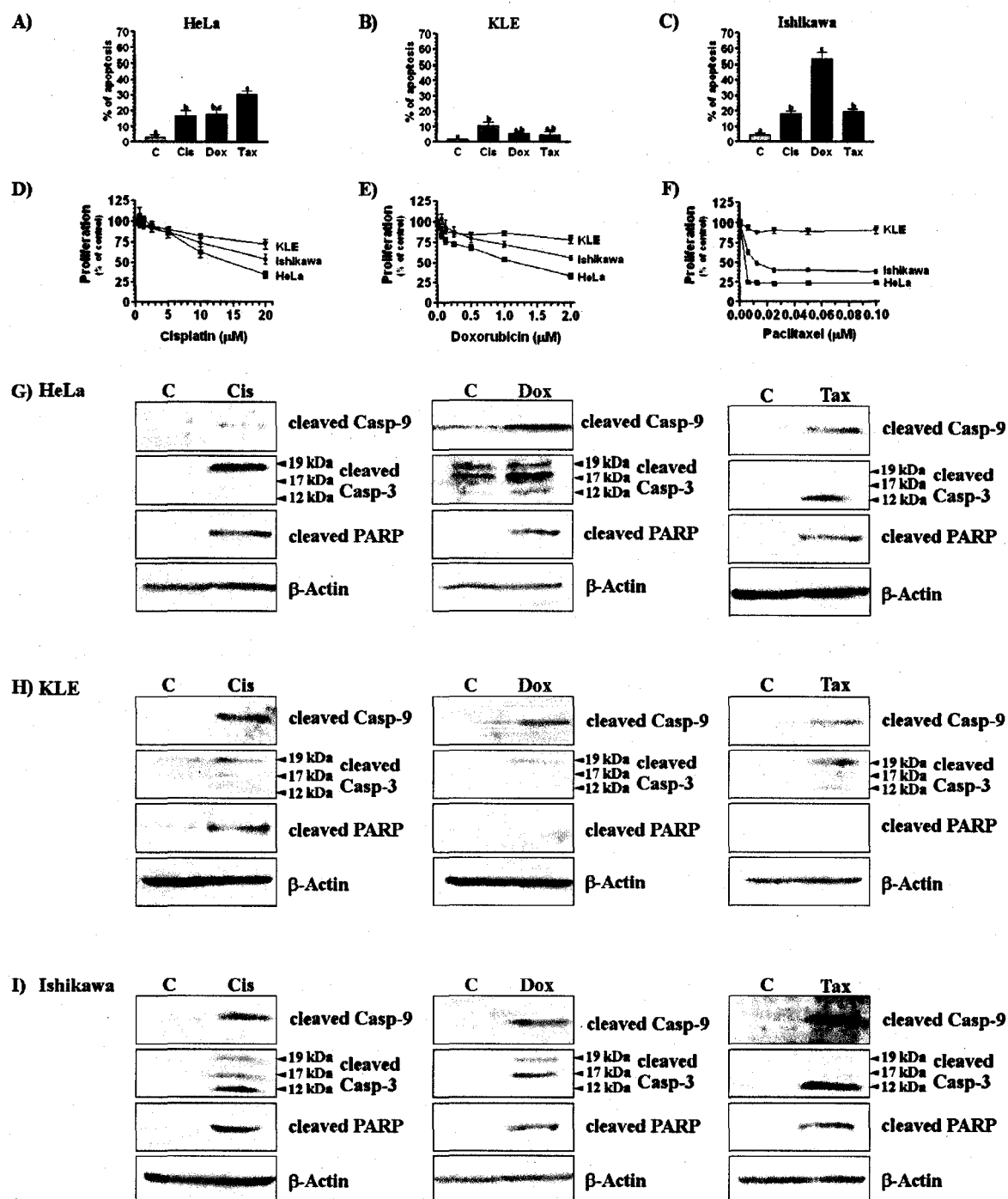


FIGURE 1 Differential sensitivity of uterine cancer cells to cisplatin, doxorubicin and taxol

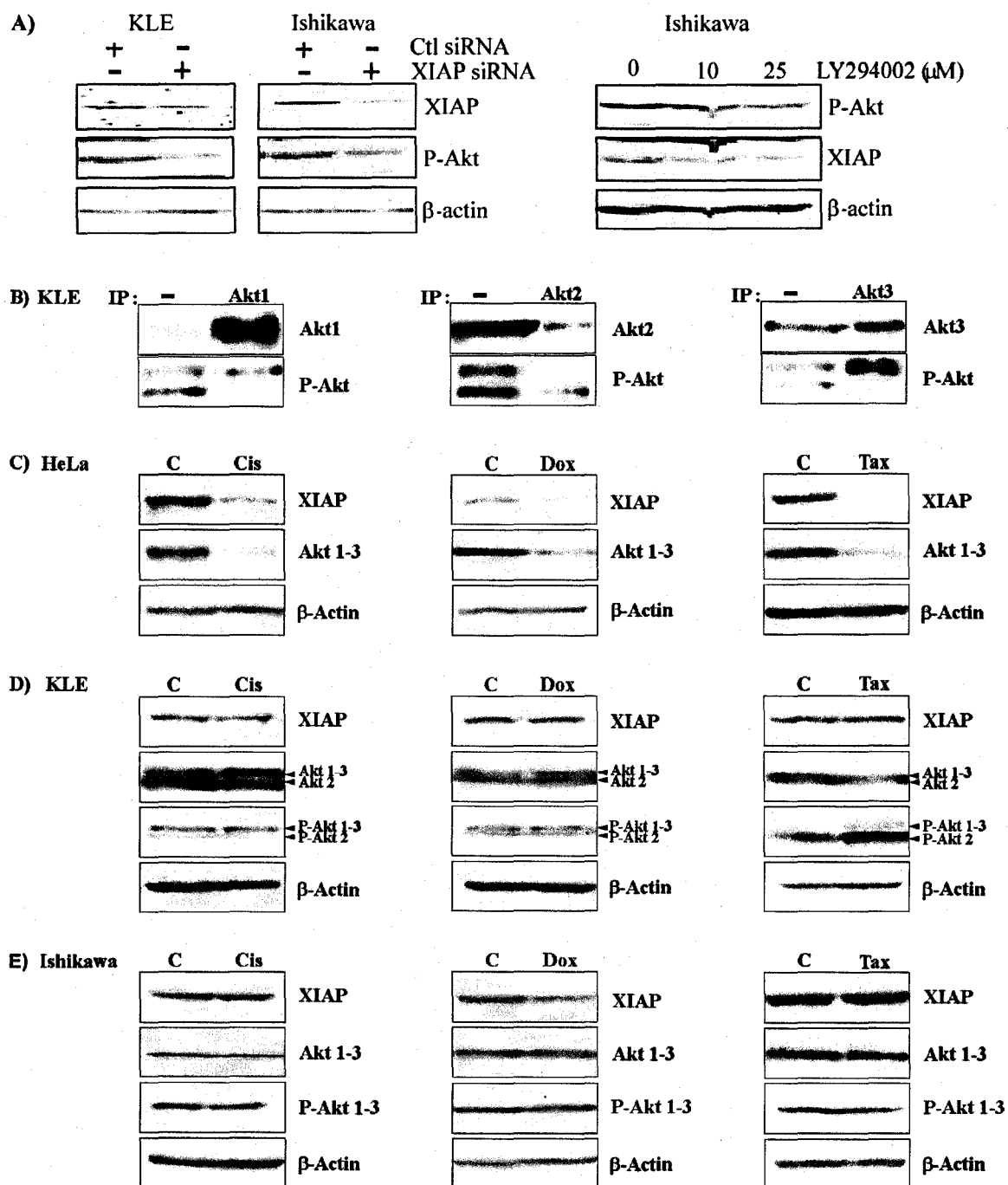


FIGURE 2 Chemotherapeutic drugs decrease Akt phosphorylation and XIAP content in P-Akt negative cells

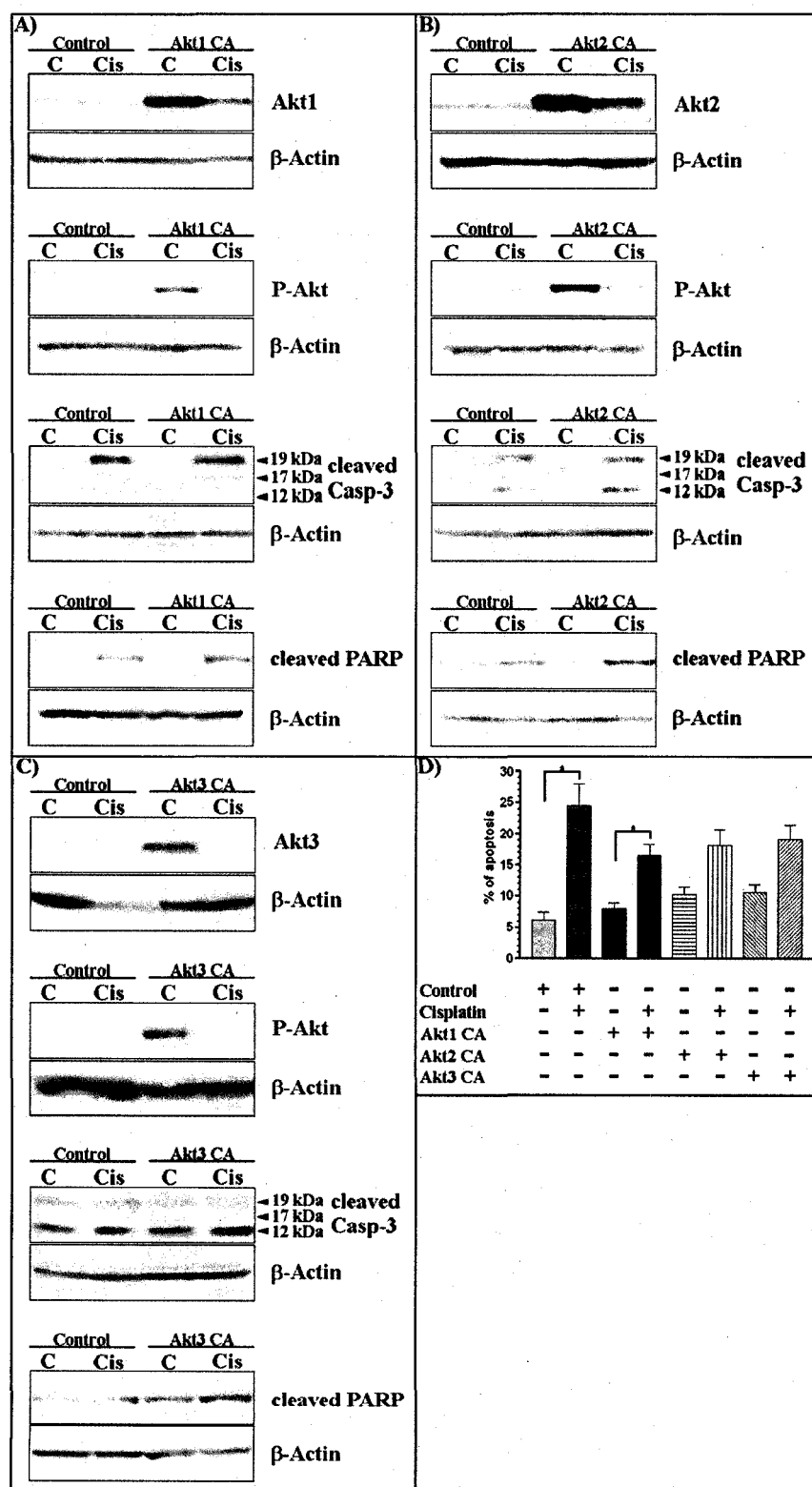


FIGURE 3 Overexpressing individual Akt isoforms does not increase resistance of HeLa cells to cisplatin-induced apoptosis

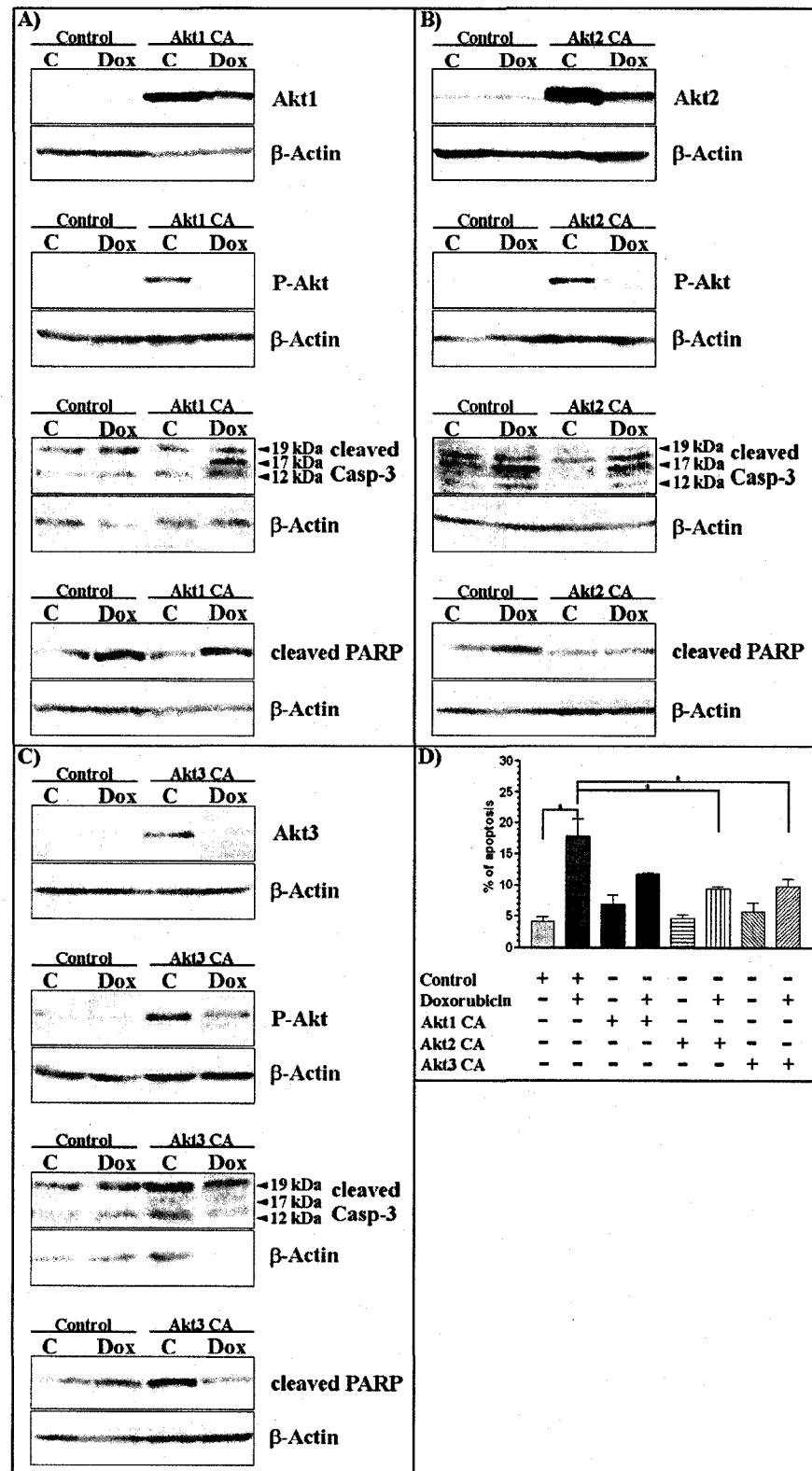


FIGURE 4 Overexpressing constitutively active Akt2 or Akt3 increases the resistance of HeLa cells to doxorubicin-induced apoptosis

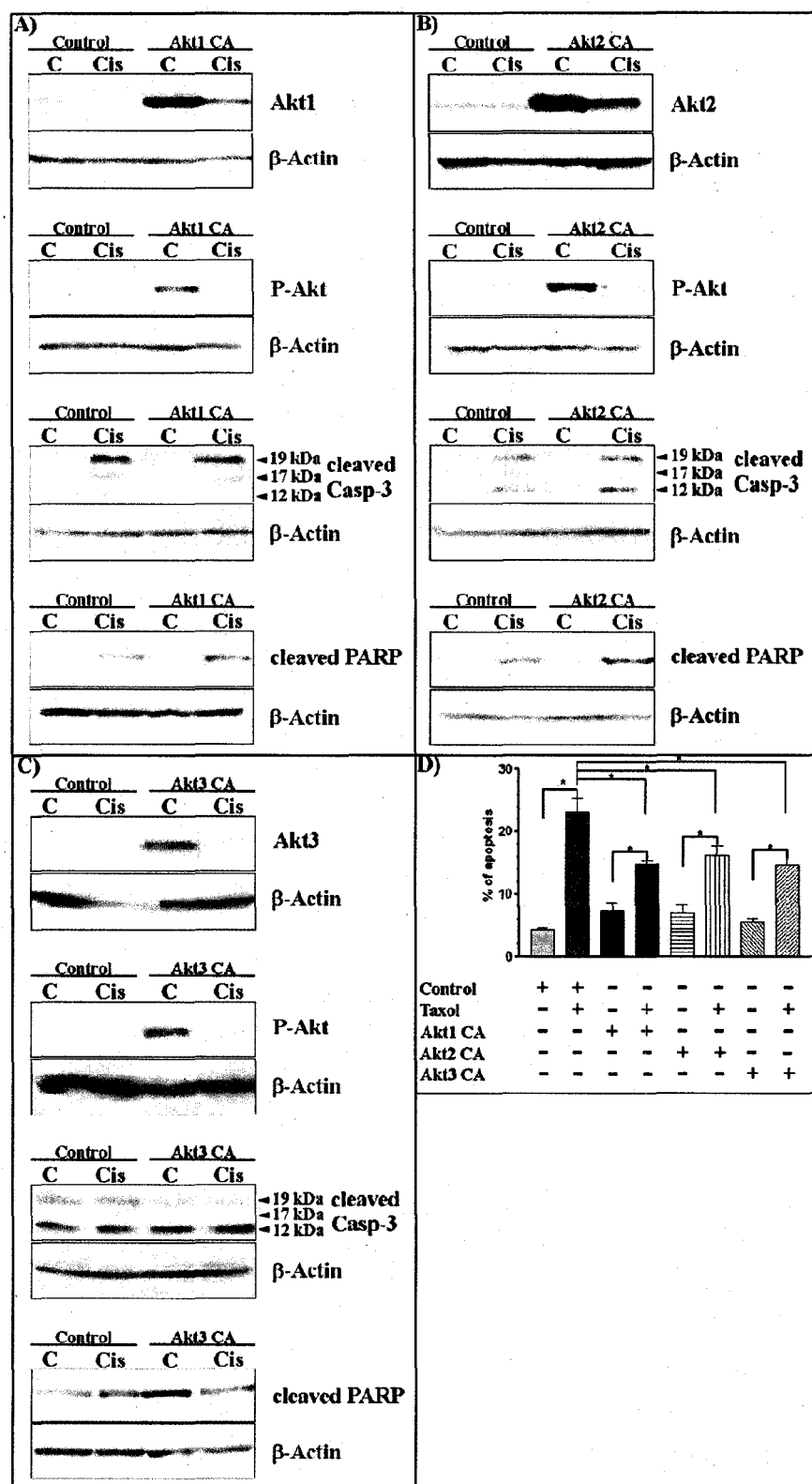


FIGURE 5 Overexpressing constitutively active Akt1, Akt2 or Akt3 increases the resistance of HeLa cells to taxol-induced apoptosis

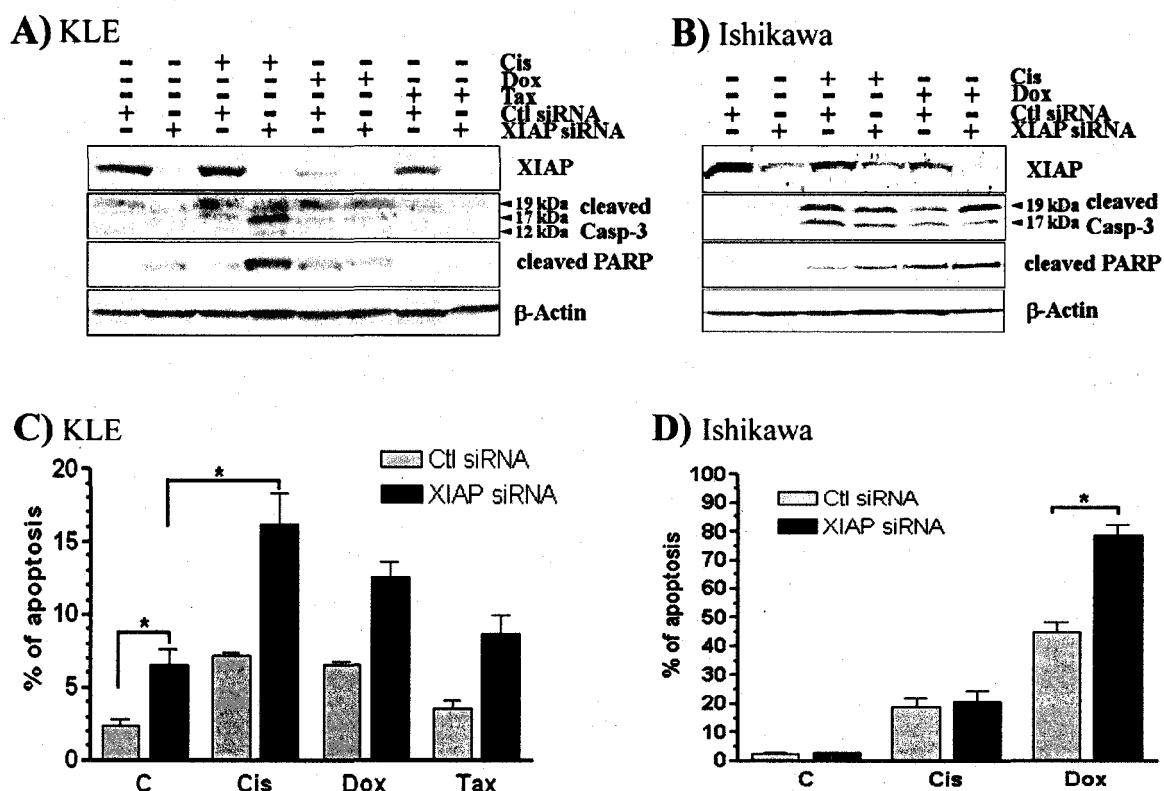


FIGURE 6 XIAP protects uterine cancer cells from cisplatin

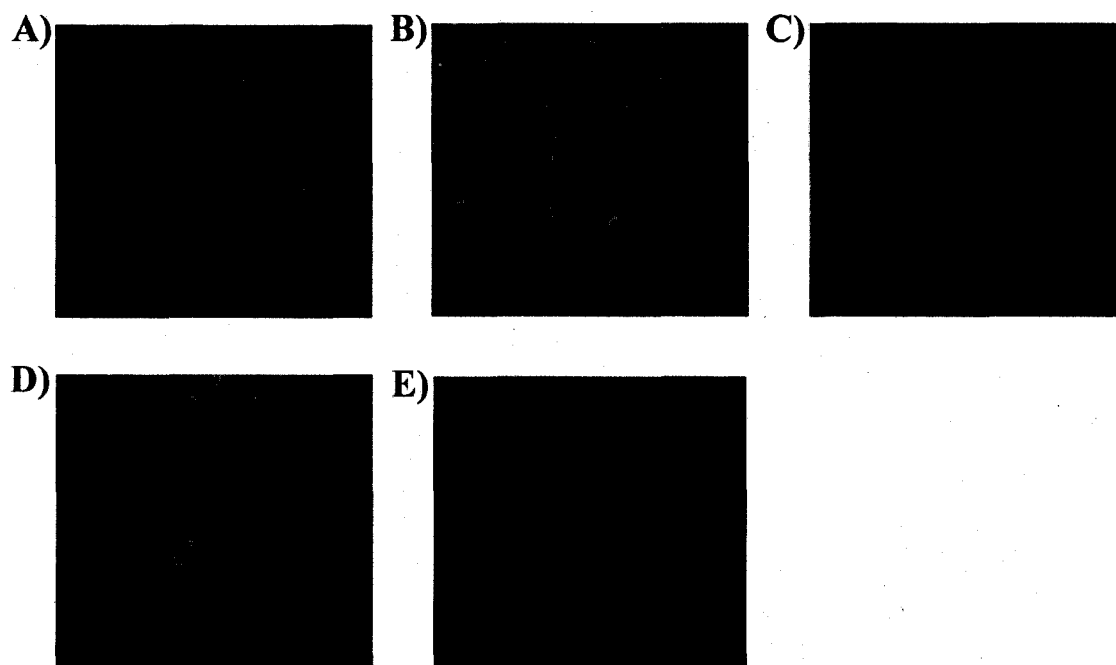


FIGURE 7 Akt is phosphorylated in human endometrial carcinoma cells *in vivo*

CHAPITRE V
INHIBITION OF TYROSINE AND ALKALINE PHOSPHATASES IN HUMAN
UTERINE CANCER CELLS

PRÉFACE

Les auteurs du chapitre V sont : Véronique Gagnon (fait les expériences, écriture de l'article), Steve Turner (fait une partie des expériences), Valérie Leblanc (fait une partie des westerns blots), Céline Van Themsche (correction de l'article) et Eric Asselin, superviseur de la thèse (correction de l'article).

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

L'objectif de cette étude est d'investiguer l'implication possible des phosphatases tyrosines et alcalines au niveau de la résistance aux drogues chez les cellules du cancer de l'utérus. Afin de vérifier l'implication possible de ces phosphatases sur la phosphorylation de la protéine Akt, nous avons utilisé une lignée du cancer du col de l'utérus (HeLa) et une lignée du cancer de l'endomètre (KLE) reconnues pour avoir la protéine PTEN à l'état sauvage et une lignée du cancer de l'endomètre (Ishikawa) ayant la protéine PTEN mutée. Chez les cellules HeLa, les résultats ont révélé que l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines diminue les niveaux de la protéine Akt1 et induit la phosphorylation de Akt. Cette augmentation de l'activité de Akt est confirmée par la phosphorylation de la protéine P70s6Kinase et résulte en la résistance au taxol. De plus, chez les cellules KLE reconnues pour être résistantes aux agents chimiothérapeutiques, l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines augmente les niveaux de phosphorylation des protéines Akt1, Akt3 et P70s6Kinase, accompagnée d'une augmentation de la résistance à la doxorubicine. Cependant, chez les cellules Ishikawa, les mêmes traitements engendrent la résistance au cisplatine et à la doxorubicine malgré que les niveaux de P-Akt demeurent stables. En conclusion, ces résultats démontrent que l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines induit la phosphorylation/activation de Akt chez les cellules ayant la protéine PTEN sauvage, tandis que celles ayant la protéine PTEN mutée demeurent avec les mêmes niveaux de P-Akt. De plus, les résultats révèlent que dépendamment des cellules utilisées, l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines engendre la résistance au cisplatine, à la doxorubicine ou au taxol.

INHIBITION OF TYROSINE AND ALKALINE PHOSPHATASES IN HUMAN UTERINE CANCER CELLS

Veronique Gagnon, Steve Turner, Valerie Leblanc,
Celine Van Themsche and Eric Asselin*

Department of Chemistry and Biology Medical Biology Section, University of Quebec
at Trois-Rivieres C.P. 500, Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7

Key words: Akt, cisplatin, doxorubicin, taxol, tyrosine phosphatase, alkaline
phosphatase, endometrial cancer.

* Corresponding Authors: Eric Asselin, PhD.
Department of Chemistry and Biology
Medical Biology Section
University of Quebec at Trois-Rivieres, C.P. 500
Trois-Rivieres, Quebec, Canada G9A 5H7
E-mail : Eric.Asselin@uqtr.ca

ABSTRACT

OBJECTIVE. The aim of this study was to investigate the involvement of tyrosine and alkaline phosphatases in the resistance of human uterine cancer cells to chemotherapeutic drugs. **METHODS.** In the present study, we have used one cervical (HeLa) and one endometrial (KLE) cancer cell lines known as wild-type PTEN (tumor suppressor phosphatase tensin homologue, a dual-specific and lipid phosphatase involved in the negative regulation of Akt phosphorylation) and one endometrial mutated inactive PTEN protein cell line (Ishikawa) to determine the possible involvement of tyrosine and alkaline phosphatases in Akt phosphorylation/activation. **RESULTS.** In HeLa cells, tyrosine and alkaline phosphatases inhibition decreased Akt1 protein levels and induced Akt phosphorylation. The increase of Akt activity was confirmed by P70s6Kinase phosphorylation and resulted in taxol resistance. Moreover, in KLE, a cell line known to be resistant to chemotherapeutic drugs, tyrosine and alkaline phosphatases inhibition increased Akt1, Akt3 and P70s6Kinase phosphorylation but decreased P-Akt2 levels. Interestingly, the increase of P-Akt1 and P-Akt3 was accompanied by an increase of doxorubicin resistance. In contrast, in mutated-PTEN Ishikawa cells, P-Akt levels were unchanged in the presence of tyrosine and alkaline phosphatases inhibitor and cisplatin and doxorubicin resistance was induced. **CONCLUSION.** Taken together, these results demonstrated that inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases induced Akt phosphorylation in wild-type PTEN endometrial and cervical cancer cells. However, this phosphorylation was unchanged in mutated-PTEN endometrial cells. Moreover, tyrosine and alkaline phosphatases inhibition induced resistance to cisplatin, doxorubicin or taxol in endometrial and cervical cancer cells.

INTRODUCTION

Protein-tyrosine phosphorylation plays a central role in regulating a variety of fundamental cellular such as communication, cellular motility, differentiation and proliferation (Brautigan 1992; Glenney, Jr. 1992; Ullrich et Schlessinger 1990). The tyrosyl phosphorylation state of a protein in the cell reflects the balance between the competing activities of the protein-tyrosine kinases (PTKs) and the protein-tyrosine phosphatases (PTPs) and regulates important signalling pathways that are involved in the control of cell proliferation, adhesion and migration. The identification of a large family of PTPs comprising two distinct groups, obtained from the purification and sequencing of human placental PTP 1B (Charbonneau et al. 1988; Tonks et al. 1988a; Tonks et al. 1988b). The first group of PTPs has been identified as receptor-like with a single transmembrane domain and variable extracellular domains. The intracellular parts of most of the receptor-like PTPs contain two tandem PTP domains (D1 and D2), with most, if not all, of the catalytic activity residing in D1. This family includes 21 members such as CD45, LAR, DEP1, PTP α and PTP μ (Ostman et al. 2006). The second group consists of non-receptor PTPs, having a single catalytic domain and a variable amino- or carboxyl-terminal regulatory domain. This group includes 16 members such as PTP 1B, SHP1, SHP2 and PTP D1 (Ostman et al. 2006). The catalytic PTP domain spans approximately 280 amino-acids and contains a highly conserved active site with a cysteine residue that is required for the catalytic activity (Guan et Dixon 1991). Dephosphorylation of substrates occurs through a two-step mechanism consisting of the formation of a covalent PTP-phosphatase intermediate that is subsequently hydrolysed. Today, it is also clear that PTPs have both inhibitory and stimulatory effects on cancer-associated signalling processes, and that deregulation of PTP function is associated with tumorigenesis in different types of human cancers (Ostman et al. 2006).

Alkaline phosphatases are a group of enzymes with less specificity that catalyze the hydrolysis of phosphate esters at an alkaline pH (Kaplan 1972). These enzymes are referred to as isoenzymes because they catalyse the same reaction and are found in the

same organism or species, but differ in certain physicochemical properties. Alkaline phosphatases are present in many tissues including bone, kidney, liver, placenta and endometrium (Kaplan 1972). In the nonpregnant and pregnant rodent and monkey uterus, these enzyme are known to be regulated by ovarian hormones (Holinka et al. 1977; Holinka et Finch 1977; Holinka et Gurpide 1979). Moreover, in Ishikawa cells, alkaline phosphatase activity is well known to be stimulated by estrogens, whereas the others steroids, namely androgens, progestins, mineralocorticoids, or glucocorticoids, have no effect on this parameter (Littlefield et al. 1990).

Akt, a serine-threonine kinase, was found to be the cellular homologue of the transforming v-Akt (Bellacosa et al. 1991). Three major isoforms of Akt encoded by three separate gene have been identified in mammalian cells, Akt1/PKB α , Akt2/PKB β and Akt3/PKB γ (Nakatani et al. 1999). Akt is activated by a variety of stimuli, including growth factor and cellular stress in a PI 3-K-dependent manner. Activation of Akt depend on the integrity of the PH domain, which binds to PI 3-K products PIP₂ and PIP₃ and on the phosphorylation of Thr308 (Thr308 in Akt2 and Thr309 in Akt3) in the activation loop and Ser473 (Ser474 in Akt2 and Ser 472 in Akt3) in the C-terminal activation domain (Chan et al. 1999). The activity of Akt is negatively regulated by PTEN, a tumor suppressor gene that is mutated in a 50-80% of human endometrial cancer. PTEN encodes a dual-specificity protein and lipid phosphatase that reduces intracellular levels of PIP₂ and PIP₃ in cells by converting them to PIP and PIP₂ respectively, thereby inhibiting the PI 3-K/Akt pathway (Maehama et Dixon 1998). Akt have a number of targets that have been implicated in the control of cell survival including transcription factors Forkhead (Brunet et al. 1999; Kops et al. 1999), CREB (Du et Montminy 1998), NF- κ B (Kane et al. 1999; Ozes et al. 1999), glycogen synthase kinase 3 (GSK-3) (Pap et Cooper 1998) and P70s6Kinase (P70s6K) (Burgering et Coffey 1995).

In the present study, we have used inhibitor of protein-tyrosine phosphatase and acid alkaline phosphatases to determine the involvement of these phosphatases in the regulation of Akt phosphorylation and in the resistance to chemotherapeutic drugs.

Protein-tyrosine phosphatase inhibition induced phosphorylation of Akt which resulted in doxorubicin or taxol resistance in wild-type PTEN cells, while they increased cisplatin and doxorubicin resistance in mutated PTEN endometrial cancer cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), cisplatin and Hoechst 33258 were obtained from Sigma (St-Louis, MO). Doxorubicin was a gift from Farmitalia Carlo Erba (Milan, Italy). Taxol was purchased from Acros Organics N.V. (Fair Lawn, NJ). DMEM-F12, BGS serum and FBS serum were obtained from HyClone (South Logan, Utah). Anti-human P-Akt (Ser 473), anti-Akt1, anti-Akt2, anti-P-GSK 3 β , anti-P-P70s6Kinase were obtained from New England Biolabs (Mississauga, ON). Anti-Akt3/PKB γ was purchased from Upstate cell signaling solutions (Lake Placid, NY). Secondary horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit and anti-mouse antibodies were obtained from BioRad (Mississauga, ON). Tyrosine, alkaline and acid phosphatase inhibitor cocktail #2 was purchased from Sigma (St-Louis, MO).

Cell culture. Human endometrial cancer cells KLE were obtained from ATCC. Ishikawa cells was generously provided by Dr Sylvie Mader (Université de Montréal, Qc, Canada) and HeLa generously provided by Dr Michel Vincent (Université Laval, Qc, Canada). Cells were cultured in 75 cm² bottles at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂. HeLa and Ishikawa cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with HEPES, BGS (2%) and gentamycin (50 μ g/mL). KLE cells were maintained in DMEM-F12 supplemented with FBS (10%) and gentamycin (50 μ g/mL).

MTT proliferation assay. Cells were plated at a density of 1.5×10^4 cells/ well (HeLa and KLE) and 2×10^4 cells/ well (Ishikawa) in 96-well plates 24 h before the assay. Cells were cultured for 6 h in the presence of phosphatase inhibitor cocktail #2 (1:1000) and for another 24 h with different concentrations of cisplatin, doxorubicin and taxol. At the end of the culture period, 10 μ L of MTT (5 mg/mL) was added to each well. After 4 h of

incubation with MTT, 100 μ L of solubilization solution (10% SDS in 0.01 M HCl) was added and the microplate was incubated overnight (37°C, 5% CO₂). The OD was read with Fluostar OPTIMA BMG (BMG LABTECH inc., Durham, NC) at 550 nm.

Phosphatase inhibitor cocktail #2 treatment. Cells were plated at a density of 2×10^6 cells in 100 mm x 20 mm dish 24 h before treatments. Cells were treated for 6 h with phosphatase inhibitor cocktail #2 (1:1000) and for another 24 h with cisplatin (5 μ M), doxorubicin (0.5 μ M) and taxol (2.5 nM). The dose and treatment time for each drug were chosen based on MTT assay results. Attached and floating cells were pooled for Western blot analysis.

Protein extraction and Western analysis. Cells were trypsinized, lysed in RIPA lysis buffer (pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1% NP-40 in PBS, protease complete inhibitor; Roche), frozen and thawed three times, then centrifuged (13000 X g, 20 min at 4°C) to remove insoluble material. The supernatant was recovered and stored at -20°C pending analysis. Protein content was determined with the Bio-Rad DC Protein Assay. Protein extracts (50 μ g) were heated (95°C, 3 min), resolved by 10% SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and electrotransferred to nitrocellulose membranes (15 V, 30 min) using a semidry transfer apparatus (Bio-Rad, Mississauga, ON). The membranes were then blocked (2 h, RT) with PBS containing 5% milk powder and Tween 0.05%, then incubated with anti-Akt1 (1:5000), anti-Akt2 (1:2000), anti-Akt3 (1:1500), anti-P-Akt (1:1500), anti-P-GSK 3 β (1:1500), anti-P-P70s6Kinase (1:3000) antibody (overnight, 4°C), and subsequently with Horse radish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:3000) or anti-mouse secondary antibody (1:2000) (RT, 45 min). Peroxidase activity was visualized with the Super signal[®] West Femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Arlington Heights, IL), according to the manufacturer's instructions.

RESULTS

Tyrosine and alkaline phosphatases inhibitor induced Akt activation and taxol resistance in HeLa cells. To determine the relationship between tyrosine phosphatase activity and resistance to chemotherapeutic drugs, treatment with phosphatase inhibitor were carried out on HeLa cells before treatment with cisplatin, doxorubicin and taxol. Inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases induced resistance to taxol in wild-type PTEN cells HeLa, but had no significant effect on cisplatin and doxorubicin-decreased cell proliferation (Fig.1 A). Moreover, phosphatase inhibition induced Akt phosphorylation. The decrease of Akt1 protein expression and the absence of P-Akt2 band following phosphatase inhibition revealed that the induction of phosphorylation of Akt seem to be on Akt1 isoform. There is ample evidence indicating that upon activation by proliferative stimuli mediated by the PI 3-K/Akt signal transduction pathway, mTOR phosphorylates/activates P70s6Kinase and P85s6Kinase isoforms (Hidalgo et Rowinsky 2000), which are differentially targeted to the cytoplasm and nucleus, respectively (Burgering et Coffey 1995). Thus, the activation of Akt was confirmed by phosphorylation of GSK 3 β and P70s6Kinase. However, P85s6Kinase phosphorylation decreased in presence of phosphatase inhibitor.

Inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases increased Akt1 and Akt3 activation and doxorubicin resistance in KLE cancer cells. To test the effect of tyrosine and alkaline phosphatase inhibition on drug resistance, endometrial-chemoresistant cancer cells KLE were treated with inhibitor of tyrosine and alkaline phosphatases prior treatment with cisplatin, doxorubicin and taxol. Inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases increased resistance to doxorubicin, but had no significant effect on cisplatin and taxol resistance in KLE cell line (Fig.2 A). In a previous report (Gagnon et al. 2007, see chapter IV), we have observed that the faster migrating band (lower band) was Akt2, while the upper band was a combination of Akt1 and Akt3. In this regard, in KLE cells, phosphatase inhibition increased Akt1 and Akt3 phosphorylation/activation but decreased significantly P-Akt2 levels (Fig.1 B). The increase of Akt activity in this cell line was confirmed by

P70s6Kinase phosphorylation. However, no GSK-3 phosphorylation was induced by tyrosine and alkaline phosphatase inhibition.

Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition induced cisplatin and doxorubicin resistance in Ishikawa cell line. To determine the role of tyrosine and alkaline phosphatase on cisplatin, doxorubicin and taxol-decreased cell proliferation, endometrial-sensitive cancer cells Ishikawa were treated with phosphatase inhibitor. Phosphatase inhibition increased cell proliferation when the inhibitor was used in combination with cisplatin and doxorubicin, but had no effect on taxol-decreased cell proliferation (Fig.3 A). Moreover, phosphatase inhibitor decreased Akt2 level and phosphorylation of P70s6Kinase, increased GSK-3 phosphorylation, but had no significant effect on Akt phosphorylation (Fig.3 B).

DISCUSSION

In the Western world, endometrial cancer is the most common gynecologic pelvic malignancy, accounting for 6% of all cancers in women, and the eighth most common cause of cancer-related death. Patients with disease confined to the uterine corpus are usually cured with hysterectomy and bilateral salpingo-oophorectomy. Surgery may be combined with adjuvant radiation therapy when high-risk features such as high-grade and/or deep myometrial invasion are present. However, treatment for recurrent or metastatic endometrial cancer and advanced disease is focused on chemotherapy. Numerous single-agent trials have been performed since the late 1970s and only a few agents like taxanes, anthracyclines and platinum produced response rate greater than 20%. Thus, chemoresistance remains a major therapeutic difficulty, and the molecular machinery leading to chemoresistance remain to be elucidated. In this regard, constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapeutic drugs in breast (Clark et al. 2002), ovarian (Page et al. 2000) and pancreas cancer cells (Fresno Vara et al. 2004). In the present study, we have demonstrated that inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases in endometrial and cervical cancer cell lines induces Akt phosphorylation in wild-type PTEN cells (HeLa and KLE), leading to increased

phosphorylation of an enzyme downstream of Akt in PI 3-K pathway, P70s6Kinase. Interestingly, inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases in mutated/inactive PTEN endometrial carcinoma cell line Ishilawa had no effect on Akt phosphorylation and activity.

As no phosphotyrosines are present in the Akt protein, it is probable that tyrosine phosphatases promote inactivation of the kinase indirectly, by affecting upstream tyrosine phosphorylation events, such as receptor tyrosine kinase activation or other phosphatases involved in the regulation of Akt. In this regard, signal transduction through the ErbB family receptor tyrosine kinase involves the PI 3-K/Akt signaling pathway. Heregulin, a known ligand for ErbB3/4, has been reported to regulate Akt in breast cancer cells (Liu et al. 1999). Moreover, Stoica et al. (2003) have demonstrated that estradiol induced PI 3-K/Akt activation via binding to estrogen receptor alpha (ER α) and his interaction and activation of an ErbB dimer containing ErbB2 (Stoica et al. 2003). Also, our study revealed that in wild-type PTEN HeLa cells, Akt phosphorylation induced by tyrosine and alkaline inhibition promoted taxol resistance. In this regard, we have recently reported this phenomenon using constitutively active Akt1, Akt2 and Akt3 vectors in these cell lines (Gagnon et al. 2007, see chapter IV). Akt phosphorylation and taxol resistance may be supported by results obtained by Kunz et al. (2006), who have recently demonstrated that inhibition of ErbB2 strongly inhibited the induction of Akt kinase in breast cancer cells and resulted in the restoration of regular sensitivity in these cells toward taxol (Kunz et al. 2006). Moreover, Tan et al. (2002) have demonstrated that ErbB2 can confer resistance to taxol-induced apoptosis by directly phosphorylating Cdc2 on tyrosine 15 in breast cancer cells (Tan et al. 2002). Further studies will be necessary to determine if the ErbB family receptor tyrosine kinase are involved in Akt phosphorylation in wild-type PTEN cells.

Apart from a possible inhibition of ErbB2-activated pathway, Akt phosphorylation following tyrosine and alkaline phosphatases inhibition in wild-type PTEN cell lines could also result from direct inhibition of receptor-like PTP LAR (leucocyte common antigen-related). LAR is a prototypical receptor PTP containing tandem domain (D1 and

D2) in its cytoplasmic region with D1, constituting the primary catalytic site, and D2, conferring regulatory function (Streuli et al. 1989). Indeed, Xie et al. (2006) have recently demonstrated in neuronal cells PC12 that inhibition of LAR function induced TrkA activation and its downstream signaling Akt and Erk (Xie et al. 2006). Further studies will be necessary to determine the possible involvement of LAR in Akt activation induced by tyrosine phosphatases inhibition in endometrial and cervical cancer cells.

Inactivation of protein phosphatase 2A (PP2A) by tyrosine phosphatase inhibition could also explain Akt phosphorylation in HeLa and KLE cells. PP2A is one of the major Ser/Thr phosphatases implicated in the regulation of many cellular processes including regulation of different signal transduction pathways, cell progression, DNA replication, gene transcription and protein translation (Janssens et al. 2005). The catalytic subunit of PP2A is inactivated by *in vitro* phosphorylation of Tyr307 by receptor and non-receptor protein tyrosine kinases (Chen et al. 1994). Resjo et al. (2002) have previously demonstrated that PP2A is the principal phosphatase that dephosphorylates Akt in rat adipocytes (Resjo et al. 2002). Incubation of adipocytes with okadaic acid, an inhibitor of PP2A and PP1B, induced the activation of Akt in these cells (Resjo et al. 2002; Ugi et al. 2004). In this regard, further studies will be necessary to evaluate the role of PP2A in Akt phosphorylation in HeLa and KLE cells.

Interestingly, in KLE cells expressing high levels of all Akt isoforms, tyrosine and alkaline phosphatases inhibition increased Akt1 and Akt3 phosphorylation, but decreased P-Akt2 levels. These results showed that the activity of the three Akt isoforms is regulated differently in endometrial cancer cells KLE. In a previous report, it has been demonstrated that SHP-2, a tyrosine phosphatase, is required for mediating PI 3-K/Akt activation by growth factors (Wu et al. 2001). In fact, prior studies have shown that the association of SHP-2 with IRS-1 modulates the ability of EGF, insulin or IGF-1 to activate PI 3-K (Hayashi et al. 2004; Ugi et al. 1996). Moreover, Kwon et al. (2006) have recently demonstrated that SHP-2 recruitment to p85 subunit of PI 3-K is required for IGF-1 stimulated activation of the PI 3-K pathway leading to Akt activation (Kwon et al. 2006). Thus, it is possible that the decrease of Akt2 phosphorylation in KLE cells

may be a consequence of SHP-2 inhibition upon exposure to tyrosine phosphatase inhibitors. Moreover, in KLE cell line, we found that inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases increased doxorubicin resistance. In this regard, we have recently demonstrated that constitutively active Akt2 and Akt3 vectors induced doxorubicin resistance in HeLa cells (Gagnon et al. 2007). Indeed, further analysis will be necessary to confirm which isoform, Akt1 or Akt3, is activated in KLE cells by tyrosine and alkaline phosphatases inhibition. Thus, if Akt3 protein is activated in response to phosphatase inhibition, Akt3 protein could be responsible for doxorubicin resistance in this cell line.

Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition induced cisplatin and doxorubicin resistance in Ishikawa cells. Moreover, no P-Akt induction was observed in this cell line. These results suggest that in mutated PTEN Ishikawa cells, Akt activation is not involved in resistance to chemotherapeutic drugs. In this context, it has been recently demonstrated that DDR1 (Discoidin domain receptor 1) activates the nuclear factor- κ B (NF- κ B) and its downstream effectors, such as COX-2 and XIAP, resulting in enhanced etoposide resistance in breast cancer cells (Das et al. 2006). In addition, we have recently demonstrated that XIAP was involved in cisplatin and doxorubicin resistance in endometrial cancer cells KLE (Gagnon et al. 2007, see chapter IV). In the current study, inhibition of tyrosine phosphatases could thus enhance DDR1 tyrosine phosphorylation and XIAP levels and, at the same time, induce cisplatin and doxorubicin resistance. Moreover, in Ishikawa cells this resistance could be explained by inhibition of the serine/threonine phosphatases PP4C, PP4R2 or PP4R3 by tyrosine and alkaline phosphatases inhibition. In this regard, Gingras et al. (2005) have previously demonstrated that deletion of components of the complex PP4cs, a yeast PP4C/PP4R2/PP4R3 complex which plays a critical role in the eukaryotic DNA damage response, yielded cisplatin hypersensitivity (Gingras et al. 2005). Further studies will be necessary to determine the possible relation between cisplatin and doxorubicin resistance and the activity of serine/threonine phosphatases, such as PP4C, PP4R2 and PP4R3, in endometrial cancers. Finally, Massart et al. (2005) have demonstrated that sodium butyrate, a histone deacetylase inhibitor, increased alkaline phosphatases activity

and cytotoxicity induced by doxorubicin (Massart et al. 2005). This phenomenon could explain doxorubicin resistance in Ishikawa cells. Further studies will be necessary to determine which mechanisms are involved in cisplatin and doxorubicin resistance in Ishikawa cells in presence of tyrosine and alkaline phosphatases inhibitors.

In this study, we showed that in a cervical cancer cell line known to express wild-type PTEN (HeLa cell line), inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases induced Akt phosphorylation and taxol resistance. Moreover, in endometrial cancer cells KLE, known to be resistant to chemotherapeutic drugs, tyrosine and alkaline phosphatases inhibition increased Akt1 and Akt3 phosphorylation and doxorubicin resistance. However, in mutated PTEN endometrial carcinoma cell line Ishikawa, inhibition of tyrosine and alkaline phosphatases induced cisplatin and doxorubicin resistance while Akt phosphorylation levels were unchanged. Additional studies will be necessary to determine the precise mechanisms by which tyrosine and alkaline phosphatases inhibitors induce Akt phosphorylation/activation in wild-type PTEN endometrial cancer cells.

REFERENCES

- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., and Tsichlis, P. N. "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region", *Science* 254, 5029: 274-277, (1991).
- Brautigan, D. L. "Great expectations: protein tyrosine phosphatases in cell regulation", *Biochim. Biophys. Acta* 1114, 1: 63-77, (1992).
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., and Greenberg, M. E. "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor.", *Cell* 96, 6: 857-868, (1999).
- Burgering, B. M. and Coffey, P. J. "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction", *Nature* 376, 6541: 599-602, (1995).
- Chan, T. O., Rittenhouse, S. E., and Tsichlis, P. N. "AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation", *Annu. Rev. Biochem.* 68, 965-1014, (1999).
- Charbonneau, H., Tonks, N. K., Walsh, K. A., and Fischer, E. H. "The leukocyte common antigen (CD45): a putative receptor-linked protein tyrosine phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 19: 7182-7186, (1988).
- Chen, J., Parsons, S., and Brautigan, D. L. "Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts", *J. Biol. Chem.* 269, 11: 7957-7962, (1994).
- Clark, A. S., West, K., Streicher, S., and Dennis, P. A. "Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells", *Mol. Cancer Ther.* 1, 9: 707-717, (2002).
- Das, S., Ongusaha, P. P., Yang, Y. S., Park, J. M., Aaronson, S. A., and Lee, S. W. "Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through Nuclear Factor- κ B pathway activation", *Cancer Res.* 66, 16: 8123-8130, (2006).
- Du, K. and Montminy, M. "CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB", *J. Biol. Chem.* 273, 49: 32377-32379, (1998).
- Fresno Vara, J. A., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., and Gonzalez-Baron, M. "PI3K/Akt signalling pathway and cancer", *Cancer Treat. Rev.* 30, 2: 193-204, (2004).
- Gingras, A. C., Caballero, M., Zarske, M., Sanchez, A., Hazbun, T. R., Fields, S., Sonenberg, N., Hafen, E., Raught, B., and Aebersold, R. "A novel, evolutionarily

- conserved protein phosphatase complex involved in cisplatin sensitivity", *Mol. Cell Proteomics*. 4, 11: 1725-1740, (2005).
- Glenney, J. R., Jr. "Tyrosine-phosphorylated proteins: mediators of signal transduction from the tyrosine kinases", *Biochim. Biophys. Acta* 1134, 2: 113-127, (1992).
- Guan, K. L. and Dixon, J. E. "Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate", *J. Biol. Chem.* 266, 26: 17026-17030, (1991).
- Hayashi, K., Shibata, K., Morita, T., Iwasaki, K., Watanabe, M., and Sobue, K. "Insulin receptor substrate-1/SHP-2 interaction, a phenotype-dependent switching machinery of insulin-like growth factor-I signaling in vascular smooth muscle cells", *J. Biol. Chem.* 279, 39: 40807-40818, (2004).
- Hidalgo, M. and Rowinsky, E. K. "The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy", *Oncogene* 19, 56: 6680-6686, (2000).
- Holinka, C. F. and Finch, C. E. "Age-related changes in the decidual response of the C57BL/6J mouse uterus", *Biol. Reprod.* 16, 3: 385-393, (1977).
- Holinka, C. F. and Gurpide, E. "In vivo effects of estetrol on the immature rat uterus", *Biol. Reprod.* 20, 2: 242-246, (1979).
- Holinka, C. F., Hetland, M. D., and Finch, C. E. "The response to a single dose of estradiol in the uterus of ovariectomized C57BL/6J mice during aging", *Biol. Reprod.* 17, 2: 262-264, (1977).
- Janssens, V., Goris, J., and Van Hoof, C. "PP2A: the expected tumor suppressor", *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15, 1: 34-41, (2005).
- Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D., and Weiss, A. "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase", *Curr. Biol.* 9, 11: 601-604, (1999).
- Kaplan, M. M. "Alkaline phosphatase", *N. Engl. J. Med.* 286, 4: 200-202, (1972).
- Kops, G. J., de Ruiter, N. D., Vries-Smits, A. M., Powell, D. R., Bos, J. L., and Burgering, B. M. "Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B", *Nature* 398, 6728: 630-634, (1999).
- Kunz, C., Borghouts, C., Buerger, C., and Groner, B. "Peptide aptamers with binding specificity for the intracellular domain of the ErbB2 receptor interfere with AKT signaling and sensitize breast cancer cells to Taxol", *Mol. Cancer Res.* 4, 12: 983-998, (2006).
- Kwon, M., Ling, Y., Maile, L. A., Badley-Clark, J., and Clemmons, D. R. "Recruitment of the tyrosine phosphatase Src homology 2 domain tyrosine phosphatase-2 to the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase is required for insulin-like growth

- factor-I-dependent PI-3 kinase activation in smooth muscle cells", *Endocrinology* 147, 3: 1458-1465, (2006).
- Littlefield, B. A., Gurpide, E., Markiewicz, L., McKinley, B., and Hochberg, R. B. "A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: estrogenic action of delta 5 adrenal steroids", *Endocrinology* 127, 6: 2757-2762, (1990).
- Liu, W., Li, J., and Roth, R. A. "Heregulin regulation of Akt/protein kinase B in breast cancer cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 3: 897-903, (1999).
- Maehama, T. and Dixon, J. E. "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate", *J. Biol. Chem.* 273, 22: 13375-13378, (1998).
- Massart, C., Poirier, C., Fergelot, P., Fardel, O., and Gibassier, J. "Effect of sodium butyrate on doxorubicin resistance and expression of multidrug resistance genes in thyroid carcinoma cells", *Anticancer Drugs* 16, 3: 255-261, (2005).
- Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D. A., Weigel, R. J., and Roth, R. A. "Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 3: 906-910, (1999).
- Ostman, A., Hellberg, C., and Bohmer, F. D. "Protein-tyrosine phosphatases and cancer", *Nature* 6, 4: 307-320, (2006).
- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., and Donner, D. B. "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase", *Nature* 401, 6748: 82-85, (1999).
- Page, C., Lin, H. J., Jin, Y., Castle, V. P., Nunez, G., Huang, M., and Lin, J. "Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis", *Anticancer Res.* 20, 1A: 407-416, (2000).
- Pap, M., and Cooper, G. M. "Role of glycogen synthase kinase-3 in the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt cell survival pathway", *J. Biol. Chem.* 273, 32: 19929-19932, (1998).
- Resjo, S., Goransson, O., Harndahl, L., Zolnierowicz, S., Manganiello, V., and Degerman, E. "Protein phosphatase 2A is the main phosphatase involved in the regulation of protein kinase B in rat adipocytes", *Cell Signal.* 14, 3: 231-238, (2002).
- Stoica, G. E., Franke, T. F., Wellstein, A., Czubayko, F., List, H. J., Reiter, R., Morgan, E., Martin, M. B., and Stoica, A. "Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway", *Mol. Endocrinol.* 17, 5: 818-830, (2003).

- Streuli, M., Krueger, N. X., Tsai, A. Y., and Saito, H. "A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and *Drosophila*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 22: 8698-8702, (1989).
- Tan, M., Jing, T., Lan, K. H., Neal, C. L., Li, P., Lee, S., Fang, D., Nagata, Y., Liu, J., Arlinghaus, R., Hung, M. C., and Yu, D. "Phosphorylation on tyrosine-15 of p34(Cdc2) by ErbB2 inhibits p34(Cdc2) activation and is involved in resistance to taxol-induced apoptosis", *Mol. Cell* 9, 5: 993-1004, (2002).
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., and Fischer, E. H. "Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta", *J. Biol. Chem.* 263, 14: 6731-6737, (1988a).
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., and Fischer, E. H. "Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta", *J. Biol. Chem.* 263, 14: 6722-6730, (1988b).
- Ugi, S., Imamura, T., Maegawa, H., Egawa, K., Yoshizaki, T., Shi, K., Obata, T., Ebina, Y., Kashiwagi, A., and Olefsky, J. M. "Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes", *Mol. Cell Biol.* 24, 19: 8778-8789, (2004).
- Ugi, S., Maegawa, H., Kashiwagi, A., Adachi, M., Olefsky, J. M., and Kikkawa, R. "Expression of dominant negative mutant SHPTP2 attenuates phosphatidylinositol 3'-kinase activity via modulation of phosphorylation of insulin receptor substrate-1", *J. Biol. Chem.* 271, 21: 12595-12602, (1996).
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity", *Cell* 61, 2: 203-212, (1990).
- Wu, C. J., O'Rourke, D. M., Feng, G. S., Johnson, G. R., Wang, Q., and Greene, M. I. "The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors", *Oncogene* 20, 42: 6018-6025, (2001).
- Xie, Y., Massa, S. M., Ensslen-Craig, S. E., Major, D. L., Yang, T., Tisi, M. A., Derevyanny, V. D., Runge, W. O., Mehta, B. P., Moore, L. A., Brady-Kalnay, S. M., and Longo, F. M. "Protein-tyrosine phosphatase (PTP) wedge domain peptides: a novel approach for inhibition of PTP function and augmentation of protein-tyrosine kinase function", *J. Biol. Chem.* 281, 24: 16482-16492, (2006).

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced cell proliferation in HeLa cells. (A) Cell proliferation was determined by conversion of MTT formazan. Cells were cultured with tyrosine and alkaline phosphatases inhibitor for 6 h and for another 24 h in presence of cisplatin (0, 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 and 10 μ M), doxorubicin (0; 0.03125; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5 and 1 μ M) and taxol (0, 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 and 10 nM). Drug treatments were represented by a dark triangle and drug treatments combined with phosphatases inhibitor by an open triangle. (B) Cells were cultured with phosphatases inhibitor for 6 h and for another 24 h in presence of cisplatin (5 μ M), doxorubicin (0.5 μ M) and taxol (2.5 nM). Western analysis was performed on total protein content for Akt1, Akt2, P-Akt, P-GSK 3 α P-P70s6Kinase.

Figure 2

Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced cell proliferation in KLE cells. (A) Cell proliferation was determined by conversion of MTT formazan. Cells were cultured with tyrosine and alkaline phosphatases inhibitor for 6 h and for another 24 h in presence of cisplatin (0, 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 and 10 μ M), doxorubicin (0; 0.03125; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5 and 1 μ M) and taxol (0, 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 and 10 nM). Drug treatments were represented by a dark circle and drug treatments combined with phosphatases inhibitor by an open circle. (B) Cells were cultured with phosphatases inhibitor for 6 h and for another 24 h in presence of cisplatin (5 μ M), doxorubicin (0.5 μ M) and taxol (2.5 nM). Western analysis was performed on total protein content for Akt1, Akt2, Akt3, P-Akt, P-GSK3 α P-P70s6Kinase.

Figure 3

Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced cell proliferation in Ishikawa cells. (A) Cell proliferation was determined by conversion of MTT formazan. Cells were cultured with tyrosine and alkaline phosphatases inhibitor for 6 h and for another 24 h in presence of cisplatin (0, 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 and 10 μ M), doxorubicin (0; 0.03125; 0.0625; 0.125; 0.25; 0.5 and 1 μ M) and taxol (0, 0.3125; 0.625; 1.25; 2.5; 5 and 10 nM). Drug treatments were represented by a dark square and drug treatments combined with phosphatases inhibitor by an open square. (B) Cells were cultured with phosphatase inhibitor for 6 h and for another 24 h in presence of cisplatin (5 μ M), doxorubicin (0.5 μ M) and taxol (2.5 nM). Western analysis was performed on total protein content for Akt1, Akt2, P-Akt, P-GSK3 α P-P70s6Kinase.

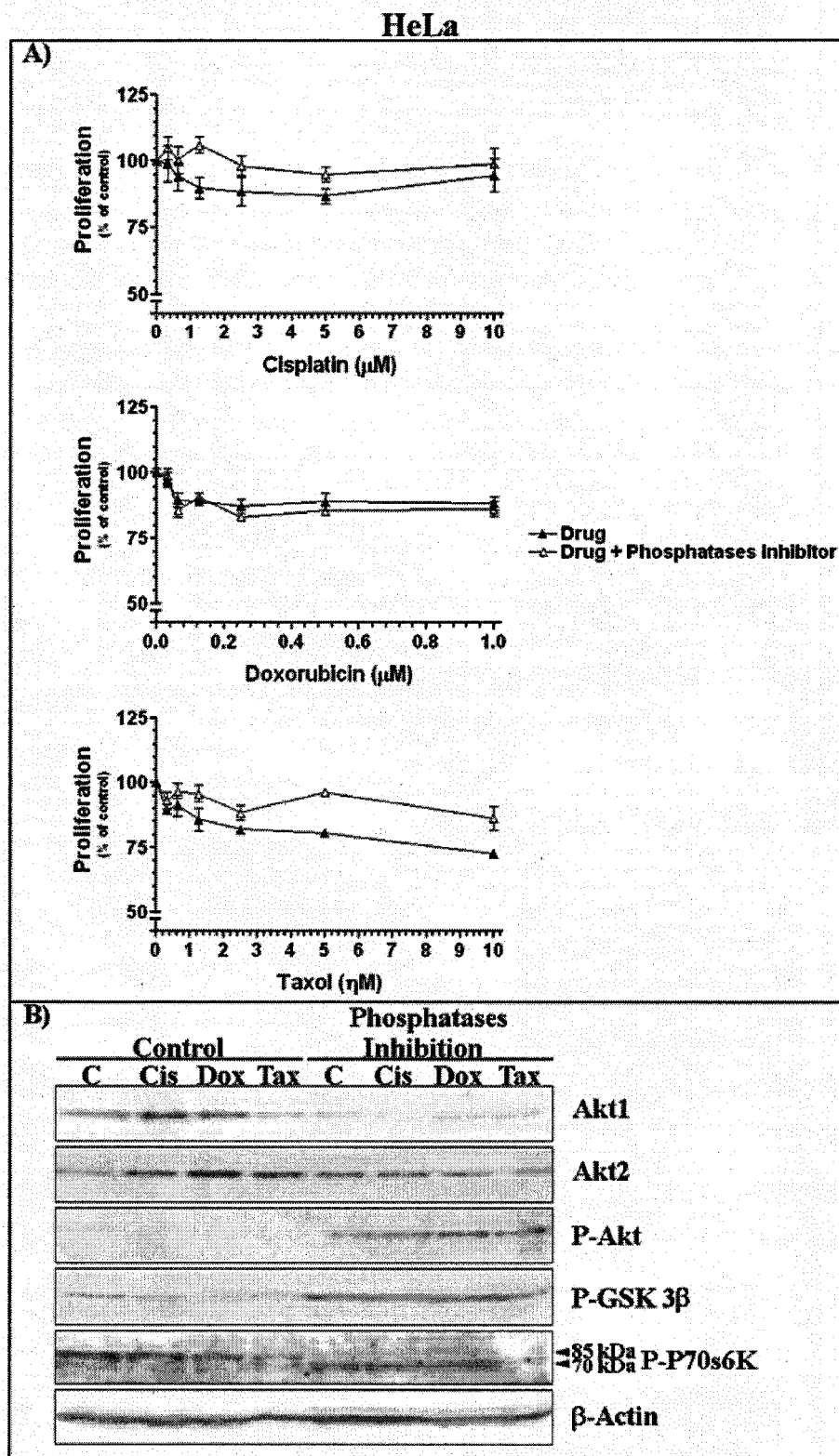


FIGURE 1 Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced apoptosis in HeLa cells

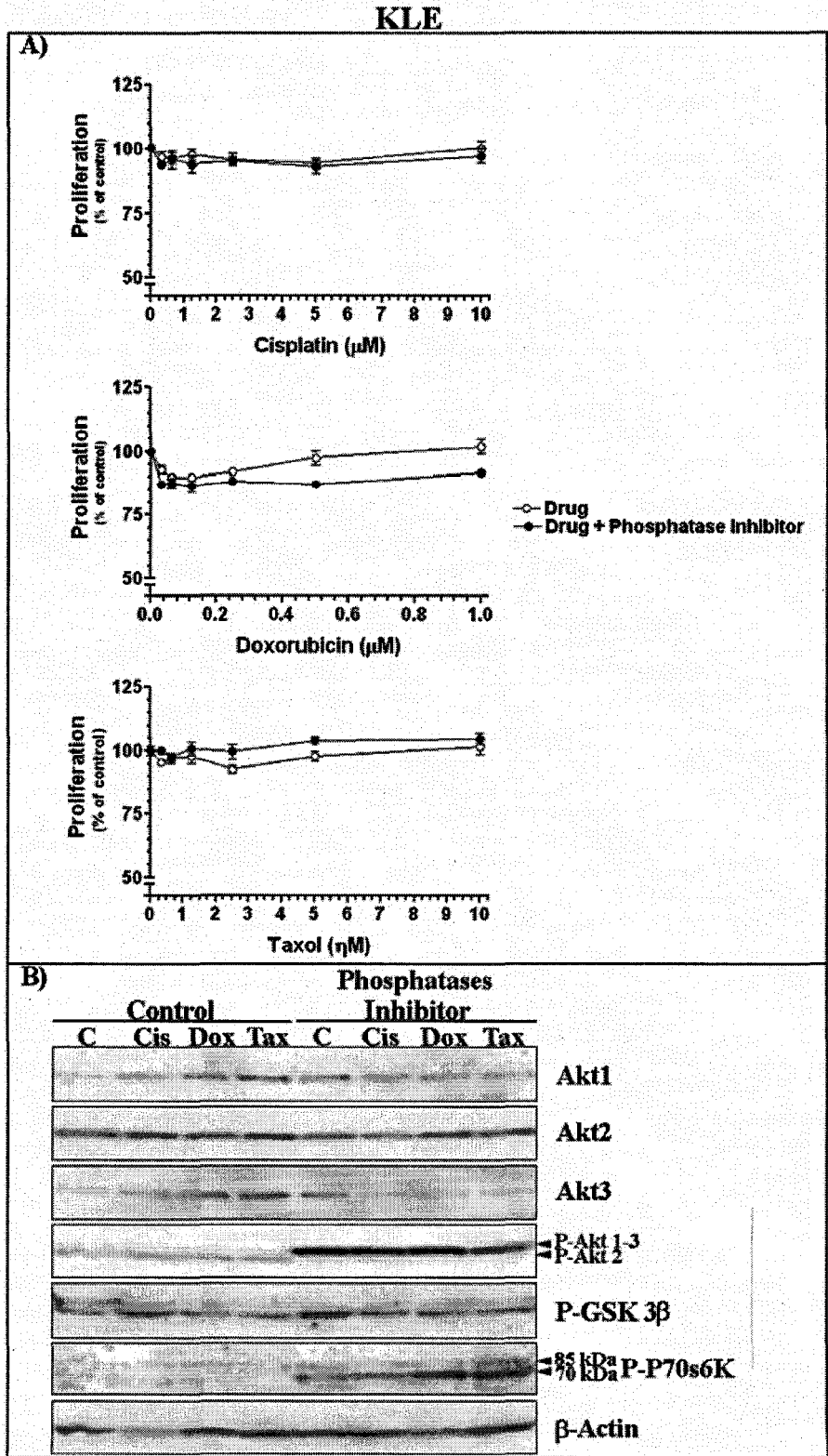


FIGURE 2 Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced apoptosis in KLE cells

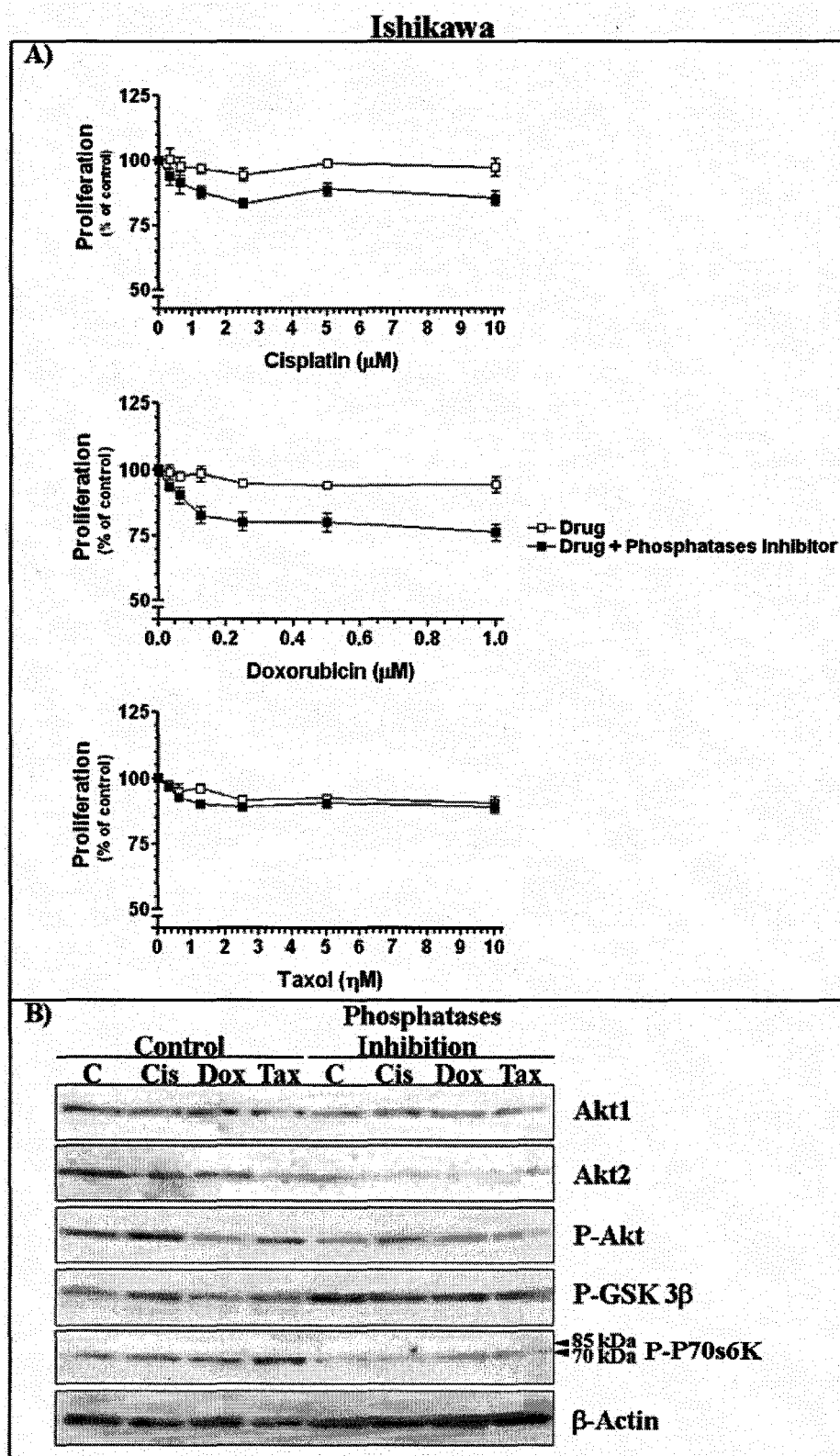


FIGURE 3 Tyrosine and alkaline phosphatases inhibition effect on cisplatin, doxorubicin and taxol-induced apoptosis in Ishikawa cells

CHAPITRE VI
DISCUSSION GÉNÉRALE

DISCUSSION ET PERSPECTIVES FUTURES

6.1 Implication de la protéine Akt dans la régulation de protéines inhibitrices d'apoptose

Le cancer de l'endomètre est le cancer gynécologique le plus important chez la femme en Occidente. Au Canada, 4100 nouveaux cas sont estimés pour l'année 2007 et environ 740 femmes en mourront cette année (Société canadienne du cancer 2007). Aujourd'hui, de nombreuses études ont démontré l'implication de la protéine Akt lors du développement de cancer, dont celui du sein (Arboleda et al. 2003), de l'ovaire (Bellacosa et al. 1995) et du poumon (Brognard et al. 2001). De plus, l'avancement des connaissances sur la protéine Akt a permis de constater qu'elle est impliquée dans une multitude de phénomènes biologiques tels que la survie et la prolifération cellulaires, l'invasion et l'angiogénèse (Bellacosa et al. 2005). C'est d'ailleurs l'analyse de telles observations qui nous a poussé à orienter nos recherches sur le rôle que pourrait jouer la voie de signalisation de PI 3-K/Akt lors d'un cancer de l'endomètre. Il a clairement été établi que Akt peut réguler diverses voies de signalisation menant à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Kane et al. 1999). De plus, plusieurs études démontrent que NF- κ B est impliqué dans l'induction de certaines protéines inhibitrices d'apoptose telles que XIAP, cIAP-1 et cIAP-2 (Erl et al. 1999; Gelfanov et al. 2001; Liston et al. 1996; Stehlik et al. 1998). Face à ces résultats, nous nous sommes intéressés au rôle que pourrait jouer la voie de signalisation PI 3-K/Akt lors de l'induction des protéines inhibitrices d'apoptose. Les résultats démontrent que chez les lignées du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN mutée/inactive et de hauts niveaux de phosphorylation de Akt, soient RL-95-2 et Ishikawa, il y a également présence de hauts niveaux des protéines cIAP-1 et Bcl-2.

Afin de vérifier l'implication possible de la voie de signalisation du PI 3-K dans la régulation des deux protéines inhibant l'apoptose, Bcl-2 et cIAP-1, nous avons débuté par faire des traitements avec la Wortmannin chez les trois lignées cellulaires utilisées pour cette étude; les HEC-1-A qui sont reconnues pour avoir la protéine PTEN sauvage ainsi que les RL-95-2 et les Ishikawa qui ont la protéine PTEN mutée. Ici, l'utilisation

de la lignée cellulaire HEC-1-A, qui ne démontre aucune phosphorylation/activation de l'oncogène Akt sert à confirmer la relation entre la voie de signalisation de PI 3-K/Akt et les protéines inhibitrices d'apoptose. En fait, selon notre hypothèse, s'il existe une telle relation, l'inhibition de PI 3-K avec la Wortmannin chez les cellules HEC-1-A ne devrait pas résulter en un changement dans les niveaux d'expression des protéines cIAP-1 et Bcl-2. C'est d'ailleurs pour cette raison que nous n'avons pas cherché à induire la phosphorylation de Akt chez cette lignée cellulaire avant de faire les traitements avec la Wortmannin. Les résultats obtenus à la suite de ces traitements démontrent une diminution significative des niveaux de cIAP-1 chez les lignées exprimant P-Akt de façon endogène. De plus, comme le stipulait notre hypothèse, aucune variation dans les niveaux de cIAP-1 est observée chez les cellules HEC-1-A, ce qui révèle que c'est bien la voie de signalisation du PI 3-K qui est impliquée dans la régulation de cIAP-1 lors de traitements avec la Wortmannin chez les cellules du cancer de l'endomètre. Les résultats démontrent également que chez les cellules RL-95-2, la Wortmannin a la capacité de diminuer les niveaux de la protéine Akt totale. Cette diminution peut être expliquée par le fait que Akt est une cible pour les caspases. En effet, il a été démontré que certaines caspases, dont la caspase-3 et la caspase-6, ont la capacité d'induire le clivage de Akt de même que son ubiquitination (Asselin et al. 2001; Medina et al. 2005). Afin de démontrer un tel phénomène chez les cellules RL-95-2, il serait important d'utiliser des inhibiteurs de caspases en combinaison avec la Wortmannin et de vérifier si l'inhibition des caspases contrecarre la diminution des niveaux de la protéine Akt totale. De plus, afin de vérifier si la protéine Akt est ubiquitinisée lors des différents traitements, il serait également intéressant d'utiliser un inhibiteur de protéasome ou de réaliser une immunoprécipitation avec l'anticorps Akt pour ensuite procéder à une analyse de type western blot et vérifier la présence de la protéine ubiquitine. Malgré le fait qu'il ait été prouvé auparavant par l'équipe de Flusberg et al. (2001) que Akt régule l'expression de Bcl-2 chez les cellules endothéliales de capillaires (Flusberg et al. 2001), nos résultats révèlent plutôt que chez les cellules du cancer de l'endomètre, Bcl-2 n'est pas régulée par la voie de signalisation PI 3-K/Akt. Il est donc possible que chez ce type de cellules, l'expression de Bcl-2 soit régulée par une voie en aval de Akt, ou en coopération avec celle-ci.

Maintenant que la relation est établie entre la voie de signalisation du PI 3-K et l'expression de la protéine cIAP-1, nous avons cherché à démontrer que la protéine Akt est impliquée dans cette relation. Ainsi, nous avons procédé à des transfections chez les cellules HeLa avec un plasmide générant la protéine Akt activée de façon constitutive (AktCA). Le fonctionnement de ces plasmides est très simple. En fait, il suffit d'ajouter à la séquence codant pour la protéine Akt une séquence de myristylation, soit les acides aminés MGSSKSKPK, ce qui permet à la protéine Akt transcrite à partir du plasmide d'être constitutivement transloquée à la membrane plasmique et d'être constitutivement phosphorylée et activée. Ainsi, lors d'une transfection avec un tel plasmide, il y a augmentation de la protéine Akt totale, mais également de la protéine Akt phosphorylée. Lors de l'utilisation d'un tel plasmide, le ratio P-Akt/Akt n'est donc pas valide puisque c'est la nouvelle protéine Akt produite à partir du plasmide qui est phosphorylée. Bien qu'il ait été démontré que l'insuline a la capacité d'induire la phosphorylation de Akt chez les cellules HeLa (Ueda et al. 2004), nous avons plutôt opté pour les plasmides AktCA puisque l'insuline, via la liaison à son récepteur, peut induire d'autres voies de signalisation dont les MAPK (Pavelic et al. 2007; Zhang et Yee 2006), ce qui n'est pas souhaitable pour notre étude puisque c'est seulement l'effet de la phosphorylation de Akt que nous désirons évaluer. L'utilisation des plasmides, quant à elle, permet de cibler notre protéine d'intérêt, soit Akt, sans induire d'autres voies de signalisation. L'analyse des résultats lors des transfections AktCA chez les cellules HeLa a révélé qu'une augmentation de la phosphorylation/activation de Akt induit également une élévation significative des niveaux de cIAP-1. Nos résultats démontrent donc, pour la première fois, que la protéine Akt induit l'expression d'une protéine inhibitrice d'apoptose : cIAP-1. Cependant, afin de démontrer si cette régulation survient à des niveaux transcriptionnels, il serait important dans un futur rapproché de déterminer les niveaux d'ARNm de ce gène à la suite de tels traitements. Dans l'éventualité que cIAP-1 est régulé au niveau transcriptionnel, il serait également important de déterminer le rôle que peut jouer le facteur de transcription NF- κ B dans l'induction de cette protéine. Plusieurs recherches ont démontré que Akt active NF- κ B chez les cellules humaines (Kane et al. 1999; Ozes et al. 1999) et que ce facteur de transcription induit l'expression de la protéine cIAP-1 chez diverses cellules cancéreuses. De plus, notre équipe a

antérieurement démontré que l'inhibition de PI 3-K par des traitements avec la Wortmanin chez les cellules RL-95-2 et Ishikawa induit une diminution de la phosphorylation de I κ B, se qui se traduit par une diminution de l'activité de NF- κ B (St Germain et al. 2004). Face à de telles découvertes, il serait donc important de vérifier si NF- κ B est également impliqué dans l'augmentation de l'expression de cIAP-1 induite par P-Akt chez les cellules du cancer de l'endomètre. Pour ce faire, nous pourrions débiter par vérifier si, chez les cellules HeLa, l'utilisation d'un plasmide AktCA induit une augmentation de l'activité de NF- κ B et si tel est le cas, nous pourrions utiliser en combinaison avec le plasmide AktCA un inhibiteur contre le facteur de transcription NF- κ B, soit le DHMEQ (dehydroxymethylepoxyquinomycin), afin de vérifier si une augmentation de la phosphorylation de Akt chez les cellules HeLa sans l'activation du NF- κ B se traduit par une augmentation de la protéine cIAP-1. Depuis notre découverte, plusieurs études ont également démontré la relation qui existe entre Akt et cIAP-1. Ainsi, l'équipe de Aggarwal et al. (2006) ont révélé que le curcumin, un agent anti-inflammatoire utilisé en médecine traditionnelle indienne, inhibe l'activation de Akt par le TNF, ce qui induit une diminution des gènes régulés par NF- κ B, tel que cIAP-1 (Aggarwal et al. 2006). De plus, une étude récente effectuées chez les cellules OSCC (oral squamous cell carcinoma) révèle que le traitement avec la Wortmannin et le LY294002 diminue la phosphorylation de Akt et augmente les niveaux d'apoptose induits par TRAIL, grâce à la modulation des niveaux de certaines protéines inhibiteurs d'apoptose dont cIAP-1 (Uchida et al. 2007).

Contrairement à ce qui a été démontré par l'équipe de Hu et al. (2004) avec différentes lignées du cancer du sein, de la prostate et du cerveau (Hu et al. 2004), P-Akt ne semble pas réguler l'expression de cIAP-2 et XIAP chez les cellules du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN mutée. Cependant, afin de démontrer que la protéine XIAP n'est pas régulée par la présence de P-Akt chez les cellules du cancer de l'endomètre, nous avons procédé à des traitements chez les cellules KLE et Ishikawa avec le LY294002, un inhibiteur de PI 3-K. Les résultats nous ont démontré que la protéine XIAP, contrairement à se que nous pensions, est bel et bien régulée par la voie du PI 3-K chez les cellules cancéreuses de l'endomètre. Des transfections avec un

plasmide AktCA serait toutefois nécessaires afin de démontrer clairement que la protéine Akt précisément est impliquée dans cette régulation. De plus, considérant que l'équipe de Asselin et al. (2001) ont démontré que l'expression abondante de la protéine XIAP augmente les niveaux de phosphorylation de Akt (Asselin et al. 2001), nous avons jugé nécessaire de vérifier si une telle relation existe dans notre système. Pour ce faire, nous avons soumis les cellules KLE et Ishikawa, qui expriment de hauts niveaux de la phosphorylation de Akt, à la technique de siRNA contre la protéine XIAP. Les résultats révèlent qu'une diminution de la protéine inhibitrice XIAP diminue la phosphorylation/activation de Akt chez les cellules KLE et Ishikawa. Grâce à de tels résultats, nous démontrons donc pour la première que chez les cellules du cancer de l'endomètre, la voie de signalisation de PI 3-K/Akt et la protéine XIAP sont en relation. Pour ce qui est de cIAP-2, il serait tout aussi important de réaliser les mêmes expériences afin de valider que la voie de signalisation de PI 3-K/Akt n'est pas impliquée dans sa régulation. Si tel est le cas, il serait important de déterminer si l'absence de régulation provient d'une différence au niveau transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. Une détermination des niveaux de l'ARNm de ce gène serait donc primordiale chez les différentes lignées cellulaires à l'étude.

6.2 Expression de la protéine Akt et son activation chez les cellules cancéreuses utérines humaines

Maintenant que la relation entre l'activité de Akt et la régulation des protéines inhibitrices d'apoptose est établie, il est important de déterminer les niveaux de cet oncogène ainsi que son activation chez les différentes lignées cancéreuses utérines utilisées pour cette étude. Chez l'humain, Akt est présent sous trois isoformes: Akt1, Akt2 et Akt3. Bien qu'ils possèdent une forte homologie entre eux, plusieurs évidences démontrent qu'ils sont régulés différemment chez les cellules et qu'ils exercent des fonctions biologiques distinctes. Il s'avère donc également important de déterminer les niveaux de chacun de ces isoformes chez les différentes lignées cellulaires. Ainsi, nous avons évalué les niveaux de Akt1, Akt2, Akt3 et de PTEN chez trois lignées du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN sauvage, les HeLa, HEC-1-A et KLE (Jin et al.

2004). Les résultats ont révélé que l'ARNm et la protéine Akt1 sont exprimés chez toutes les lignées cellulaires étudiées, tandis que l'ARNm et la protéine Akt2 et Akt3 sont fortement présents chez les cellules cancéreuses de l'endomètre KLE. De plus, de hauts niveaux de la phosphorylation de tous les isoformes de Akt sont observés chez cette même lignée cellulaire. Cela est tout à fait surprenant, étant donné qu'elle exprime également de hauts niveaux de la protéine PTEN et que ce gène suppresseur de tumeur a été reconnu pour bloquer la phosphorylation de Akt (Maehama et Dixon 1998).

Plusieurs mécanismes pourraient mener à l'activation constitutive de Akt chez les cellules KLE. Étant donné que la protéine PTEN est mutée dans 50% à 80% des cas de cancer de l'endomètre (Hale et al. 2002; Sun et al. 2001a), il pourrait s'agir de phénomènes agissant au niveau de ce gène suppresseur de tumeur. Afin de déterminer si le gène PTEN possède des mutations chez la lignée cellulaire KLE, nous avons procédé à des analyses de séquençage, ce qui nous a permis de conclure qu'aucune mutation dans ce gène n'est présente chez les cellules KLE. Ces observations suggèrent donc que d'autres mécanismes, incluant la régulation épigénétique de PTEN, peuvent contribuer à la perte de fonction de cette protéine chez les cellules KLE. Ainsi, l'acétylation de PTEN peut également être impliquée dans la diminution de son activité lipide phosphatase. En effet, Okumura et al. (2006) ont révélé que PCAF (p300/CBP-associated factor), une histone acétyltransférase, induit l'acétylation de PTEN au niveau de son domaine catalytique, ce qui cause une diminution significative de son activité phosphatase et, par le fait même, une augmentation de la phosphorylation de Akt (Okumura et al. 2006). Il serait donc important de déterminer les niveaux d'acétylation de PTEN chez les cellules KLE. De plus, il a été démontré que la protéine PTEN peut être phosphorylée en C-terminal, ce qui conduit à une diminution de sa dégradation par le protéosome ainsi que de son activité lipide phosphatase (Vazquez et al. 2000). Il a été établi que cette phosphorylation est induite de façon constitutive par la protéine kinase CK2 (casein kinase II) (Torres et Pulido 2001). Il serait donc important dans un avenir proche de déterminer si la protéine PTEN est phosphorylée chez les cellules KLE et si les niveaux de CK2 sont élevés chez cette même lignée cellulaire.

Nos résultats démontrent que le LY294002, à faibles doses (0,5 et 5 μ M), n'a pas la capacité de diminuer les niveaux de P-Akt chez les cellules KLE. Ainsi, la phosphorylation constitutive de Akt pourrait être causée par de hauts niveaux d'expression des deux sous-unités du PI 3-K. Ainsi, il serait important dans un avenir rapproché de déterminer les niveaux d'expression des sous-unité p85 α et p85 β de même que ceux pour les sous-unités p110 α , p110 β et p110 γ . De plus, une mutation atteignant la sous-unité régulatrice de PI 3-K, soit p85 pourrait également être impliquée dans l'activation de la protéine Akt chez les cellules KLE. Un tel événement génétique conduit à l'activation constitutive de la sous-unité catalytique et de ses substrats, dont Akt (Jimenez et al. 1998). Dans un tel cas, la présence de la protéine PTEN pourrait ne pas être suffisante pour contrecarrer l'effet de l'activation constitutive de PI 3-K. Une étude de la séquence de PI 3-K chez les différentes lignées cellulaires utilisées pour cette étude s'avèrerait intéressante et pourrait expliquer les hauts niveaux de P-Akt chez les cellules KLE. De plus, il a été démontré à plusieurs reprises que l'activation constitutive de Akt peut être induite par l'augmentation de l'activité du récepteur ErbB2/HER2 (Clark et al. 2002; Li et al. 2005). Dans un tel cas, une délétion ou l'expression excessive du gène peuvent être observées, résultant en une activation permanente du récepteur et en l'augmentation des niveaux de P-Akt (Moscatello et al. 1995; Prenzel et al. 2001). Ainsi, il serait important de vérifier les niveaux de ErbB2/HER2 chez les cellules KLE afin de déterminer si un tel récepteur peut conduire à l'activation constitutive de Akt. Cependant, il a également été démontré que de hauts niveaux de ErbB2/HER2 seulement ne sont pas suffisants pour induire cette réponse et que c'est plutôt l'hétérodimérisation et la liaison de HER2 et HER3 qui conduit à l'activation de Akt. Ainsi, l'analyse des niveaux de HER3 serait également très importante. Étant donné que le hyaluronan, un très gros polysaccharide de la matrice extracellulaire, est également reconnu pour réguler l'activité des membres de la famille HER, via l'interaction avec son récepteur, le CD44 (Misra et al. 2005), il serait tout aussi important de quantifier les niveaux de ce polysaccharide, de même que de son récepteur, chez la lignée cellulaire KLE.

Il a également été démontré que Akt peut être activée de façon constitutive par la protéine Ras (Li et al. 2005). Cette induction peut se faire de deux façons différentes. La première implique la phosphorylation de la sous-unité p85 de PI 3-K, ce qui conduit en la formation d'un complexe avec le récepteur et les protéines Shc, Grb-2 et Sos résultant en l'activation de Ras. Cependant, Ras est capable d'induire l'activation de la sous-unité catalytique p110 γ de PI 3-K sans l'aide de p85 (McCubrey et al. 2006). Ainsi, il serait important dans un avenir rapproché de déterminer les niveaux de la protéine Ras chez les lignées cellulaires à l'étude. Si ceux-ci s'avèrent élevés, il serait tout aussi important de déterminer si Ras a la capacité d'induire la phosphorylation de Akt chez les cellules KLE. Si tel est le cas, il serait intéressant de vérifier, à l'aide de siRNA pour les sous-unités p85 et p110, si Ras induit l'activation/phosphorylation de Akt grâce à la sous-unité catalytique p110 γ , sans l'aide de p85.

Certains membres de la famille des Wnt peuvent également être impliqués dans l'activation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt. Cette famille comporte plus de 15 glycoprotéines reconnues pour se lier à des récepteurs transmembranaires de la famille des «frizzled». À la suite d'une activation des récepteurs par les Wnt, la protéine cytoplasmique Dvl (Dishevelled) inhibe l'activité de GSK-3 β , ce qui conduit à la transcription de gènes dont celui de la cycline D1 par la β -catenin (Akiyama 2000), puis à la progression du cycle cellulaire. Ainsi, l'équipe de Hwang et al. (2004) a révélé que Wnt-7a inhibe l'apoptose chez les cellules de cartilage humain en activant la survie cellulaire par la voie de signalisation de PI 3-K/Akt (Hwang et al. 2004). De plus, il a récemment été démontré que Wnt-3a induit l'activation de Akt de façon dépendante de PI 3-K (Kim et al. 2006). Face à ces résultats, il serait intéressant de déterminer les niveaux d'expression des différents membres de la famille des Wnt et vérifier l'implication que pourrait avoir chacun d'entre eux sur l'activation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt chez les cellules du cancer de l'endomètre.

Bien que toutes les révélations mentionnées précédemment peuvent expliquer les hauts niveaux de phosphorylation de Akt chez les cellules KLE malgré la présence du gène suppresseur de tumeur PTEN à l'état sauvage, une étude récente publiée par

l'équipe de Mori et al. (2007) démontre qu'il n'existe aucune corrélation significative entre l'expression de P-Akt et les mutations survenant dans le gène de PTEN et du PI 3-K (Mori et al. 2007). De plus, ils révèlent également que l'activation de Akt dans ce type de cellules cancéreuses de l'endomètre ne mène pas à la phosphorylation de mTOR ou des membres de la famille Forkhead, mais qu'elle est plutôt fortement associée avec l'activation de ERK1 et ERK2 (Mori et al. 2007). Face à de tels résultats, il serait donc très important dans un avenir rapproché d'évaluer les niveaux d'expression des protéines ERK1 et ERK2 ainsi que leur niveau de phosphorylation chez les différentes lignées utilisées pour cette étude afin de vérifier si chez les cellules KLE les niveaux de P-ERK1 et P-ERK2 sont plus abondants que chez les autres lignées cancéreuses utérines humaines. Cependant, malgré ces nouvelles informations, il ne faudrait tout de même pas négliger les explications révélées précédemment et en tenir compte pour les expérimentations futures.

Lorsque nous analysons de façon plus approfondie les westerns de Akt et P-Akt obtenus chez les cellules KLE, nous pouvons constater que le patron des protéines démontre la présence de deux bandes. Étant donné que lors des différents traitements, comme celui avec le taxol ou les inhibiteurs de phosphatases tyrosines et alcalines, les résultats ont démontré une diminution et/ou une augmentation de la bande d'en haut ou de celle du bas, nous avons cherché à identifier la nature exacte de ces deux bandes. Auparavant, il a été démontré par Okano et al. (2000) que chez les cellules cancéreuses de l'oesophage, la bande migrant le plus rapidement est Akt3 (Okano et al. 2000). Afin de vérifier cette affirmation, nous avons procédé à des immunoprécipitations en utilisant les anticorps pour chacun des isoformes de la protéine. Nous avons observé, comparativement à Okano et al. (2000), que chez les cellules KLE, la bande migrant le plus rapidement est en fait Akt2, tandis que la bande du haut est une combinaison de Akt1 et Akt3. Cette différence pourrait être expliquée par le taux de modifications post-transcriptionnelles des protéines. Dans notre cas, il pourrait s'agir de la glycosylation, c'est-à-dire l'attachement d'un groupe glucidique à la chaîne latérale des asparagines, sérines et thréonines (Lodish et Darnell 1997). Ainsi, il a antérieurement été démontré que la mobilité électrophorétique des protéines glycolysées est anormale lors de

l'analyse par gel d'électrophorèse (SDS-PAGE) (Wheatley et Hawtin 1999). En fait, les protéines glycosylées migrent avec un poids moléculaire plus élevé que celles n'ayant pas subi de glycosylation. Cependant, cet effet n'est pas dû à une augmentation de la masse, mais plutôt par la liaison du carbohydrate avec le polypeptide de SDS (Wheatley et Hawtin 1999). Chez la lignée cellulaire KLE, l'isoforme Akt2 pourrait subir moins de glycosylation que les isoformes Akt1 et Akt3, ce qui expliquerait qu'elle migre plus rapidement. Une étude des niveaux de glycosylation pour chacun des isoformes s'avèrerait donc importante. À ce propos, il a récemment été démontré que l'isoforme Akt1 peut subir une glycosylation par la O-GlcNac (O-linked N-acetylglucosamine) au niveau d'une sérine et d'une thréonine (Gandy et al. 2006). Cette même équipe a également révélé que des traitements avec IGF-1 augmentent les niveaux de glycosylation de l'isoforme Akt1, ce qui conduit à son exportation vers le noyau et que celle-ci est dépendante de PI 3-K (Gandy et al. 2006). Cependant, à l'heure actuelle, aucune information n'est fournie quant aux niveaux de glycosylation des trois isoformes de la protéine Akt et de l'impact possible que peut avoir une telle modification post-traductionnelle au niveau de leur activité.

Afin de déterminer les niveaux de mort cellulaire par apoptose que peut occasionner l'inhibition de PI 3-K chez les lignées cancéreuses utérines humaines, nous avons procédé à des traitements avec le LY294002 et la Wortmannin (résultats non présentés dans cette thèse) chez les lignées HeLa et HEC-1-A qui ne démontrent aucune activation de la protéine Akt et chez les cellules KLE qui démontrent de hauts niveaux de la phosphorylation de Akt. Les résultats démontrent qu'à faibles doses, les inhibiteurs de PI 3-K n'engendrent aucun effet chez les trois lignées utilisées. Au vu du fait que le LY294002 est une molécule perméable à la membrane plasmique, il serait étonnant que l'absence d'effet rencontrée lors de traitements à faibles doses chez les cellules KLE soit due à un problème de pénétration/rétention de l'inhibiteur. De plus, étant donné qu'il ait été démontré que la LY294002 a la capacité de bloquer l'exportation de différentes drogues via les pompes d'exportation telle MRP1 (multidrug protein 1) (Abdul-Ghani et al. 2006), il serait tout aussi étonnant que ce type de pompe puisse être impliquée dans l'exportation du LY294002 hors de la cellule et ainsi diminuer sa

concentration intracellulaire. Les résultats démontrent également qu'à fortes doses, le LY294002 induit l'apoptose chez les cellules KLE, mais également chez les cellules ne démontrant aucune phosphorylation de la protéine Akt, soit les HeLa et les HEC-1-A, ce qui nous pousse à croire que les résultats obtenus à la dose de 50 μ M semblent être reliés à un effet toxique et/ou non spécifique à la protéine Akt. Dans un tel cas, la voie des MAPK peut être pointée du doigt, puisqu'il a antérieurement été démontré que le LY294002 à 10 μ M inhibe l'activation de ERK2 chez les cellules CHO (Cowen et al. 1996). Ainsi, il serait intéressant d'évaluer les niveaux de phosphorylation de ERK1 and ERK2 chez les cellules cancéreuses utérines humaines à la suite des traitements avec de fortes doses de LY294002. Enfin, comme les cellules KLE sont résistantes à la mort cellulaire induite par des traitements avec de faibles doses de LY294002, nous nous sommes demandés si cette même lignée cellulaire serait également résistante à divers agents chimiothérapeutiques.

6.3 La résistance aux agents chimiothérapeutiques chez les cellules cancéreuses utérines humaines

Les patientes souffrant d'un cancer de l'endomètre peuvent avoir recours à la chirurgie combinée avec la radiothérapie. Cependant, divers facteurs peuvent empêcher ce type de traitement. Dans un tel cas, la chimiothérapie est utilisée dont les agents les plus souvent utilisés sont le cisplatine, la doxorubicine et la taxol. Bien que chacun d'entre eux démontre un taux de réponse d'environ 25%, la résistance à ces drogues est omniprésente. Ainsi, il est primordial de connaître les mécanismes impliqués dans ce procédé. Afin de déterminer l'efficacité des trois drogues mentionnées ci-haut chez deux lignées du cancer de l'endomètre (KLE et Ishikawa) et une lignée du cancer du col de l'utérus (HeLa), nous avons procédé au comptage des cellules apoptotiques en présence ou en absence des drogues, ainsi que l'analyse des niveaux des protéines impliquées dans la mort cellulaire par apoptose de façon dépendante des caspases. Les résultats révèlent la présence de la caspase-9, de la caspase-3 et de PARP sous la forme clivée chez les cellules HeLa et Ishikawa à la suite des traitements avec les trois agents chimiothérapeutiques utilisés. Cependant, pour ce qui est des cellules KLE, nous

constatons que la croissance cellulaire est modestement inhibée par le cisplatine et la doxorubicine. Par contre, bien que ces deux drogues induisent le clivage de la caspase-9, de la caspase-3 et de PARP, le cisplatine seulement induit significativement la mort cellulaire par apoptose chez ces cellules. Les traitements avec le taxol, quant à eux, ne diminuent pas la croissance des cellules KLE, mais démontrent tout de même l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3, sans l'activation de la protéine PARP. L'absence du clivage de PARP en présence de taxol peut s'expliquer par l'incapacité de cette drogue de diminuer les niveaux de XIAP, car il est bien établi que cette protéine a la capacité d'inhiber la caspase-3 (Takahashi et al. 1998).

À la suite des traitements aux divers agents chimiothérapeutiques, lorsque nous comparons les niveaux de diminution de la prolifération cellulaire versus le comptage de cellules apoptotiques par la méthode de Hoechst, nous pouvons constater que dans la majorité des cas, la proportion n'est pas conservée. Par exemple, pour le traitement des cellules avec le taxol, nous pouvons visualiser que la prolifération cellulaire des cellules HeLa et Ishikawa chute de 75% et 60% respectivement. Cependant, lors du comptage des cellules par la méthode de Hoechst, nous obtenons seulement au niveau d'apoptose de 32% pour les Hela et 20% pour les Ishikawa. De plus, lorsque nous regardons l'analyse des protéines par «Western Blot», nous pouvons également constater que les niveaux de la caspase-3 clivée de même que de PARP clivé sont relativement bas, comparativement à la diminution de la prolifération cellulaire engendrée par les différents traitements. Ces résultats nous suggèrent donc que les cellules peuvent mourir par un procédé autre que l'apoptose dépendante des capsases. À cet effet, il a été démontré qu'il existe d'autres types de mort cellulaire. Parmi celles-ci notons la mort cellulaire par apoptose de façon indépendante des caspases ainsi que la mort par nécrose, par sénescence, par autophagie et par catastrophe mitotique. Chacune d'entre elles survient à un moment bien précis et plusieurs changements, tant au niveau morphologique et que biochimique, permettent de faire leur distinction (Tableau 6.1).

Les dommages rencontrés lors de la mort cellulaire par apoptose indépendante des capsases sont pratiquement identiques à ceux rencontrés lors de la mort par apoptose

Type de mort cellulaire	Changements morphologiques		
	Noyau	Membrane cellulaire	Cytoplasme
Apoptose dépendante des caspases	<ul style="list-style-type: none"> • Condensation de la chromatine • Fragmentation de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Remodelage de la membrane 	<ul style="list-style-type: none"> • Formation de corps apoptotiques
Apoptose indépendante des caspases	<ul style="list-style-type: none"> • Condensation de la chromatine • Fragmentation de l'ADN (50kpb) 	Aucun changement	<ul style="list-style-type: none"> • Rétrécissement de la cellule
Nécrose	<ul style="list-style-type: none"> • Dégradation de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • Rupture de la membrane 	Aucun changement
Sénescence	<ul style="list-style-type: none"> • Changements de la structure chomatine 	Aucun changement	<ul style="list-style-type: none"> • Aplatissement du cytoplasme
Autophagie	<ul style="list-style-type: none"> • Condensation partielle de la chromatine 	<ul style="list-style-type: none"> • Remodelage de la membrane 	<ul style="list-style-type: none"> • Augmentation du nombre de vésicules autophagique
Catastrophe mitotique	<ul style="list-style-type: none"> • Formation d'une multitude de petits noyaux 	Aucun changement	Aucun changement

TABEAU 6.1 : Caractéristiques des différents types de mort cellulaire adapté de Okada, H. et Mak, T.W. "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells" Nature 4 : 592-603 (2004).

caspase-dépendante. Cependant, les fragments observés à la suite de la fragmentation de l'ADN sont plus volumineux (50kpb) et aucun corps apoptotique n'est observable (Van Loo et al. 2001). De plus, ce type de mort cellulaire implique des protéines mitochondriales dont AIF (apoptosis-inducing factor) et l'endonucléase G (Van Loo et al. 2001) qui, à la suite de l'induction de l'apoptose sont exportées vers le noyau où ils induiront la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN, sans avoir recours à l'activation des caspases. La nécrose, quant à elle, est la cause de diverses conditions pathophysiologiques dont l'inflammation. Les traumatismes rencontrés lors de ce type de mort cellulaire causent un affaiblissement des voies physiologiques normales qui sont essentielles pour la maintenance de l'homéostasie, telles que la régulation du transport des ions, la production d'énergie et la balance du pH cellulaire (Nicotera et Melino 2004). Lors de la nécrose, des dommages morphologiques importants surviennent et causent des bris cellulaires profonds incluant une distorsion de la membrane, une dégradation des organelles, un gonflement cellulaire et la rupture de la cellule (Kerr et al. 1972). La perte de l'intégrité membranaire suivie du relâchement des composants cellulaires induit donc une réponse inflammatoire. La sénescence est caractérisée par le rétrécissement du cytoplasme qui survient sans la rupture de la membrane plasmique. Au niveau biochimique, les cellules en sénescence subissent une augmentation de leur activité lysosomale, qui se traduit par l'induction de l'activité SA- β -gal (senescence-associated β -galactosidase) (Dimri et al. 1995). Pour ce qui est de la mort cellulaire par autophagie, celle-ci survient lorsque la digestion des constituants cellulaires est excessive ou lorsque ceux-ci sont essentiels à la survie (Pattingre et al. 2005). Au niveau morphologique, l'autophagie est caractérisée par un remodelage de la membrane plasmique et une condensation partielle de la chromatine, sans fragmentation de l'ADN. Enfin, la mort cellulaire par catastrophe mitotique survient lorsque le point de contrôle présent durant la phase G₂ du cycle cellulaire est défectueux. Dans un tel cas, la cellule entre en mitose de façon prématurée, c'est-à-dire avant que la réplication de l'ADN ne soit complétée ou que les dommages à l'ADN ne soient réparés. Cette mitose aberrante conduit donc la cellule à mourir grâce à la catastrophe mitotique (Kamijo et al. 1997; Okada et Mak 2004). Du point de vue morphologique, survient la fragmentation nucléaire qui génère une multitude de petits noyaux.

Étant donné que ces types de mort cellulaire peuvent survenir à la suite des traitements aux agents chimiothérapeutiques que nous avons effectués chez les cellules cancéreuses de l'endomètre, il serait très important de pouvoir évaluer la proportion de cellules mourant par chacun d'entre eux. Cependant, à l'heure actuelle, peu d'informations sont fournies en ce qui concerne les méthodes de détection pour chacun de ces types de mort cellulaire. En fait, c'est la microscopie électronique qui se révèle la technique de choix pour nous permettre de les différencier (Lin et al. 2007; Okada et Mak 2004). Cependant, quelques expérimentations bien précises nous permettraient, au moins, de faire la distinction entre la mort cellulaire par apoptose caspase-dépendante et caspase-indépendante. En fait, il suffit d'utiliser des inhibiteurs de caspases et de vérifier s'il y a tout de même présence de mort cellulaire. De plus, en combinaison avec cette expérimentation, il serait très important de vérifier, par immunofluorescence, les niveaux de la protéine AIF dans le noyau. Ainsi, lors de prochaines études effectuées pour déterminer les effets occasionnés par le cisplatine, la doxorubicine et le taxol chez les cellules du cancer de l'endomètre, il serait important d'évaluer de façon plus précise le type de mort cellulaire engendré par chacune de ces drogues.

6.4 Akt et la résistance aux drogues chez les cellules cancéreuses utérines humaines

De nombreuses études démontrent que la protéine Akt est impliquée dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques. En effet, chez des cellules cancéreuses du sein, plusieurs équipes ont observé qu'une diminution de l'activation de Akt avec le LY294002 ou un plasmide AktDN, augmente la sensibilité des cellules à la doxorubicine et au taxol (Clark et al. 2002; Knuefermann et al. 2003). Cependant, chez les cellules cancéreuses du poumon, l'utilisation d'un vecteur AktCA induit une résistance au cisplatine, mais n'a aucun effet sur l'efficacité de la doxorubicine et du taxol (Schmidt et al. 2002). De telles études démontrent bien que la résistance aux drogues est dépendante du tissu atteint. Ainsi, étant donné que les cellules KLE expriment beaucoup de P-Akt et qu'elles sont résistantes aux drogues, nous nous sommes intéressés à l'implication possible de la protéine Akt, et de chacun de ses isoformes, lors de la résistance au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol. Nous avons donc soumis les cellules n'ayant

pas de P-Akt endogène, les HeLa, à des transfections avec les plasmides exprimant la protéine Akt1, Akt2 ou Akt3 de façon constitutive. Nous avons observé que les trois isoformes de Akt n'ont aucun effet au niveau de la résistance au cisplatine, mais diminuent l'efficacité du taxol chez ce type cellulaire. Nos résultats sont en accord avec ceux de l'équipe de Page et al. (2000) qui stipulaient que les cellules du cancer de l'ovaire exprimant Akt1 de façon constitutive ou ayant une amplification excessive du gène Akt2 sont très résistantes au taxol (Page et al. 2000). De plus, nos résultats démontrent aussi l'implication de l'isoforme Akt3 lors d'une telle résistance, ce qui n'avait jamais été réalisé auparavant. Étant donné que l'équipe de VanderWeele et al. (2004) a démontré que l'augmentation de la résistance au taxol induite par l'activité excessive de Akt est également engendrée par la protéine mTOR (VanderWeele et al. 2004), il serait intéressant de vérifier si, dans notre modèle, cette protéine est impliquée dans la résistance au taxol. Nos résultats révèlent également que les plasmides Akt2CA et Akt3CA induisent la résistance à la doxorubicine. Étant donné que le vecteur Akt1CA n'a aucun effet au niveau de la sensibilité des cellules HeLa envers la doxorubicine, nous démontrons pour la première fois, que chacun des isoformes de la protéine jouent un rôle distinct dans la résistance à la doxorubicine.

Bien que les transfections avec les plasmides exprimant Akt1, Akt2 et Akt3 de façon constitutive n'aient pas induit de résistance au cisplatine chez les cellules HeLa, nous nous sommes demandés si une diminution simultanée de deux isoformes de la protéine Akt, en l'occurrence Akt1 et Akt2, pourrait sensibiliser les cellules KLE à cette drogue. Nous avons donc soumis cette lignée cellulaire à la technique de siRNA contre les isoformes Akt1 et Akt2, dont la séquence ciblée est inconnue. Nos résultats ont révélé, pour la première fois, que la diminution de deux isoformes de la protéine Akt en même temps augmente l'efficacité du cisplatine chez les cellules du cancer de l'endomètre résistante à cette drogue. Cependant, il ne faut pas oublier qu'il est maintenant recommandé au vu des effets « off-target » fréquents des siRNA d'utiliser plusieurs siRNAs afin de valider que c'est bien la cible visée qui est responsable de l'effet observable. Ainsi, il serait important de valider nos résultats en effectuant les mêmes traitements, mais cette fois avec un ou deux autres siRNA contre les isoformes

Akt1 et Akt2, dont la séquence ciblée serait connue cette fois-ci. Par la suite, l'inhibition de deux isoformes simultanément a d'ailleurs permis à l'équipe de DeFeo-Jones et al. (2005) de constater que la diminution simultanée de Akt1 et Akt2 potentialise l'efficacité de la doxorubicine et de la camptothécine comparativement à la diminution d'un seul isoforme à la fois (DeFeo-Jones et al. 2005). Face à de tels résultats, il serait donc primordial de déterminer si d'autres combinaisons (Akt1-Akt3, Akt2-Akt3 et Akt1-Akt2-Akt3) pourraient diminuer les niveaux de résistance au cisplatine chez les cellules KLE. De plus, afin de démontrer que c'est bel et bien l'expression différentielle de Akt2 et Akt3 qui est responsable de la résistance au cisplatine, il serait également important de cibler un isoforme à la fois. Cependant, nos résultats préliminaires obtenus pour l'isoforme Akt3 révèlent que cet isoforme ne semble pas impliqué dans la résistance au cisplatine. De tels résultats portent à croire que l'inhibition d'un seul isoforme à la fois permet aux autres isoformes non diminués par le siRNA de compenser pour la perte de l'isoforme cible. L'analyse des niveaux de phosphorylation spécifique pour chaque isoforme à l'aide de la technique d'immunoprécipitation serait donc très importante lors des expérimentations visant à diminuer un seul isoforme à la fois. Enfin, comme nos résultats démontrent que certains isoformes de la protéine Akt induisent la résistance à la doxorubicine et au taxol chez les cellules HeLa, il serait tout aussi important de déterminer, à l'aide de la technique de siRNA contre un ou plusieurs isoformes de la protéine Akt, si une diminution des niveaux d'activation de Akt engendre une diminution de la résistance à la doxorubicine et au taxol chez les cellules KLE.

6.5 La phosphorylation de Akt observée à différents grades du cancer de l'endomètre

Les résultats obtenus au cours de cette étude nous révèlent donc que la protéine Akt est impliquée dans la résistance à la doxorubicine et au taxol chez les cellules du cancer de l'endomètre. Face à ces résultats, nous nous sommes interrogés sur l'abondance que pourrait avoir la phosphorylation de Akt à différents grades d'un cancer de l'endomètre. Ainsi, nous avons procédé à des immunofluorescences sur des coupes de tissus pour les grades I, II et III du cancer de l'endomètre ainsi que pour des tissus endométriaux sains. Nous observons que chez les tissus sains ainsi que dans les grades I

et II du cancer de l'endomètre, les niveaux de la phosphorylation de Akt sont très élevés et se situent en majorité au niveau des cellules épithéliales glandulaires. L'analyse par immunofluorescence démontre également que les niveaux de P-Akt sont à la limite de la détection lors d'un cancer de l'endomètre de grade III. Ces résultats contredisent ceux obtenus récemment par l'équipe de Rice et al. (2006) qui démontrait plutôt que chez un cancer de l'endomètre de grade III, les niveaux de P-Akt sont très élevés (Rice et al. 2006). Cependant, ils observaient également que chez ce même grade, les niveaux du récepteur à l'oestrogène α (ER α) sont très faibles. Ainsi, leurs résultats sont en contradiction avec ce qui a déjà été établi par l'équipe de Dery et al. (2003) et Guzeloglu et al. (2004) qui révélaient que l'oestradiol a la capacité d'augmenter les niveaux de P-Akt chez les cellules endométriales de rat (Dery et al. 2003) et d'humain (Guzeloglu et al. 2004) respectivement. Ce sont plutôt nos résultats qui démontrent le lien entre l'oestradiol et P-Akt, puisque s'il y a de faibles niveaux de ER α lors d'un grade III du cancer de l'endomètre, il devrait y avoir également peu de P-Akt. La différence observable entre l'équipe de Rice et al. (2006) et notre équipe peut s'expliquer par le fait que leurs résultats ont été obtenus par la technique de « Western blot » (Rice et al. 2006). Ainsi, pour recueillir les protéines des biopsies, ils ont dû broyer leurs échantillons et utiliser toutes les cellules présentes. Il se peut donc qu'il y ait eu présence de cellules endométriale normales ainsi que du sang à l'intérieur de leur spécimen, ce qui peut fausser les résultats obtenus. Dans leur cas, il aurait été préférable de combiner à la fois la technique de « Western blot » et d'immunofluorescence. Pour nous, il serait également important d'augmenter la quantité d'échantillons étudiés et, si cela est possible, d'utiliser des biopsies provenant de femmes atteintes de cancer de l'endomètre afin de quantifier les niveaux de protéines par « Western blot » et par immunofluorescence.

Étant donné que nos résultats démontrent que les niveaux de phosphorylation de Akt sont très faibles lors d'un cancer de l'endomètre en grade III, il serait maintenant important d'expliquer les causes de la perte de P-Akt en grade avancé de la maladie. À leur actuelle, aucune explication n'est fournie permettant de comprendre un tel phénomène. Selon l'équipe de Mori et al. (2007), la progression du cancer de

l'endomètre en haut grade requière probablement d'autres voies de signalisation (Mori et al. 2007). Étant donné que la phosphorylation de la protéine Akt survient à une sérine et une thréonine, l'analyse des niveaux d'expression et d'activité des phosphatases sérine et thréonine serait donc très importante. Chez les eucaryotes, la déphosphorylation des sérines et des thréonines est effectuée par deux groupes de phosphatases : la PPM (phosphoprotein M), représentée par la phosphatase PP2C (protéine phosphatase 2-C), et la famille des PPP (serine/threonine-specific phosphoprotein phosphatase) (Barford et al. 1998). Parmi cette classe, notons la présence de la sous-famille PP2A (protéine phosphatase 2-A) comprenant les phosphatases PP2A, PP4C (protéine phosphatase 4-C) et PP6C (protéine phosphatase 6-C) (Cohen 1997b). Comme il a été établi précédemment que la protéine Akt peut être déphosphorylée et inactivée par PP2A (Ugi et al. 2004; Van Kanegan et al. 2005), il serait donc très important de déterminer les niveaux de celle-ci chez les différents grades du cancer de l'endomètre. De plus, il a également été démontré que la protéine Akt peut être déphosphorylée par d'autre type de phosphatases, dont les PHLPP (PH domain leucine-rich repeat protein phosphatase) (Gao et al. 2005). Fait intéressant, il a également été reconnu que PHLPP1 et PHLPP2 régulent des isoformes différents de la protéine Akt. En fait, l'équipe de Brogard et al. (2007) a révélé que PHLPP1 module la phosphorylation de HDM2 et GSK-3 α via Akt2, tandis que PHLPP2 régule la phosphorylation de p27 à partir de Akt3 (Brognard et al. 2007). L'étude des niveaux d'expression et d'activité de PHLPP1 et PHLPP2 s'avèrerait très importante dans nos lignées cellulaires, car elle pourrait permettre de comprendre pourquoi les cellules KLE expriment de hauts niveaux de la phosphorylation de Akt2 et Akt3 comparativement aux autres lignées cellulaires étudiées.

Les résultats que nous avons obtenus révèlent la présence de hauts niveaux de phosphorylation de Akt dans les cancers de l'endomètre de grade I et II. Si nous tenons compte des ceux acquis avec les transfections avec les plasmides Akt1CA, Akt2CA et Akt3CA, nous pouvons prédire que les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre de grade I ou II répondront faiblement aux traitements avec la doxorubicine et le taxol. De plus, si nous procédions à l'analyse des niveaux d'expression de chacun des isoformes de la protéine, nous serions peut-être en mesure de déterminer que ces hauts niveaux de

phosphorylation de la protéine Akt surviennent à la fois chez l'isoforme Akt1, Akt2 et Akt3. De tels résultats indiqueraient également que les femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre de faible grade associé avec de hauts niveaux de la phosphorylation des trois isoformes de la protéine sont possiblement résistantes au cisplatine. Dans un tel cas, l'alternative thérapeutique serait donc d'utiliser une combinaison d'agents chimiothérapeutiques. Dans ce cas, l'utilisation de drogues agissant à des niveaux cellulaires différents s'avère le meilleur choix. Il serait donc avantageux d'utiliser des combinaisons telles que le cisplatine avec la doxorubicine, le cisplatine avec le taxol et la doxorubicine avec le taxol. Cependant, l'équipe de Fleming et al. (2004) a démontré que la combinaison de choix lors d'un cancer de l'endomètre est celle comprenant les trois drogues utilisées pour cette étude soient le cisplatine, la doxorubicine et le taxol. Lorsque comparée avec la combinaison doxorubicine + cisplatine (34% de taux de réponse), celle utilisant les trois agents chimiothérapeutiques s'avère plus efficace (57% de taux de réponse) (Fleming et al. 2004). Pour ce qui est des femmes atteintes d'un cancer de l'endomètre de grade III, bien que les niveaux de phosphorylation de la protéine Akt semblent très faibles à ce grade, il serait également plus sécuritaire d'utiliser la combinaison renfermant les trois drogues, puisqu'à l'heure actuelle, aucune information n'est connue pour expliquer le caractère invasif de ce grade sans la présence de P-Akt (Mori et al. 2007).

6.6 Les protéines inhibitrices d'apoptose et la résistance aux drogues chez les cellules cancéreuses utérines humaines

Au vue du fait que l'équipe de Asselin et al. (2001) ont démontré que le cisplatine possède la capacité de diminuer le taux de la protéine XIAP chez les cellules du cancer de l'ovaire (Asselin et al. 2001), nous nous sommes également intéressé à l'effet que pourrait avoir les trois drogues utilisées pour cette étude sur les niveaux de diverses protéines. Nous avons observé que l'expression de la protéine XIAP est diminuée lorsque les cellules HeLa sont traitées avec le cisplatine, la doxorubicine et le taxol. Ce phénomène est d'ailleurs observé chez les cellules Ishikawa, mais seulement pour la doxorubicine. La capacité des cellules HeLa et Ishikawa à diminuer l'expression

de la protéine XIAP à la suite des traitements avec les agents chimiothérapeutiques peut s'expliquer par le fait que cette protéine possède dans son domaine RING une activité E3 qui permet son autoubiquitination et sa dégradation par le protéosome (Yang et al. 2000). D'ailleurs, il a déjà été démontré que TRAIL a la capacité d'induire l'ubiquitination et la dégradation de XIAP par le protéosome (Shi et al. 2005). Le cisplatine, la doxorubicine et le taxol pourraient donc initier l'ubiquitination de la protéine XIAP chez les cellules HeLa.

Comme l'analyse des résultats nous a révélé que les agents chimiothérapeutiques n'ont pas la capacité de diminuer les niveaux de XIAP chez les cellules KLE, nous nous sommes demandés si une diminution de la protéine par la technique de siRNA pourrait sensibiliser ces cellules aux drogues. Nous avons observé que la diminution de XIAP sensibilise les cellules KLE au cisplatine, mais ne potentialise pas l'efficacité de la doxorubicine et du taxol lorsque comparé à l'utilisation du siRNA seul. De plus, l'utilisation de la technique du siRNA chez les cellules Ishikawa a démontré que la protéine inhibitrice d'apoptose XIAP a la capacité d'augmenter le pouvoir apoptotique de la doxorubicine chez les cellules Ishikawa. Le fait que le cisplatine et la doxorubicine soient des agents anti-cancéreux agissant au niveau de l'ADN, tandis que le taxol se lie plutôt aux microtubules, pourrait expliquer pourquoi les mécanismes de résistance sont différents. Ainsi, nos résultats vont dans le même sens que ceux obtenus par l'équipe de Tirro et al. (2006) puisqu'ils révèlent eux aussi que le cisplatine et la doxorubicine démontrent les mêmes mécanismes induisant la résistance comparativement au taxol, mais cette fois chez les cellules du cancer de la thyroïde (Tirro et al. 2006). En fait, ils stipulent qu'une diminution des niveaux de cIAP-1 et Survivin potentialisent la cytotoxicité du cisplatine et de la doxorubicine, tandis qu'une augmentation de Smac augmente l'efficacité du taxol. Nos résultats démontrent également que chez les cellules KLE, le taxol a la capacité d'induire la phosphorylation de Akt2. Nos résultats corcordent avec ceux obtenus par Mabuchi et al. (2002) qui révèlent que le taxol induit l'activation de Akt chez les cellules de l'ovaire (Mabuchi et al. 2002). Cependant, à ce moment, aucun isoforme précis n'avait été ciblé, ce qui démontre l'importance de notre découverte. Cette augmentation des niveaux de P-Akt2 pourrait également expliquer

pourquoi une diminution de XIAP ne parvient pas à abolir la résistance à cet agent chimiothérapeutique. En effet, comme mentionné un peu plus tôt, nos résultats démontrent qu'une augmentation des niveaux de P-Akt2 induit la résistance au taxol chez les cellules HeLa. Ce mécanisme pourrait donc être présent chez les cellules KLE et contrecarrer l'effet d'une diminution de la protéine XIAP.

La relation entre XIAP et la résistance aux drogues qui a été établie dans cette étude nous pousse à croire que d'autres IAPs peuvent également être impliqués dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques chez les cellules KLE. À cet effet, il a été démontré que la perte de fonction de la protéine p53 est associée avec une augmentation de la régulation de la protéine inhibiteur d'apoptose Survivin (Sah et al. 2006). Comme il a été démontré que le gène suppresseur de tumeur p53 est muté chez les cellules KLE (Yaginuma et Westphal 1991), entraînant ainsi une diminution de son activité biologique, il serait important de vérifier chez cette lignée cellulaire si les niveaux de Survivin sont élevés comparativement à ceux présents chez une autre lignée du cancer de l'endomètre ayant la protéine p53 fonctionnelle. Si les résultats démontrent que la protéine Survivin est abondante chez les cellules KLE, il serait tout aussi important de vérifier si Akt peut induire l'expression de Survivin, puisque nous avons déjà observé que la protéine Akt induit l'expression d'une protéine inhibiteur d'apoptose. De nombreuses études ont également révélé que Survivin induit la résistance au cisplatine (Li et al. 2006a; Sharma et al. 2005) à la doxorubicine (Li et al. 2006b; Wang et al. 2003) et au taxol (Pratt et al. 2006; Yan et al. 2006) chez différents types de cancers. Face à ces résultats, il serait important de vérifier, à la suite de la confirmation de la présence de Survivin chez les cellules KLE, si cette protéine est impliquée dans la résistance aux drogues rencontrées chez cette même lignée cellulaire. Il est à noter que d'autres IAP sont également responsables du caractère de résistance présent chez certaines lignées cellulaires. Ainsi, l'équipe de Lopes et al. (2007) a récemment démontré que l'expression abondante de cIAP-2 corrèle avec la résistance au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol chez les cellules cancéreuses du pancréas (Lopes et al. 2007). De plus, il a été révélé qu'une diminution des niveaux de la protéine Livin par la technique de siRNA est associée avec l'activation de la caspase-3 et l'augmentation du

pouvoir apoptotique de la doxorubicine (Crnkovic-Mertens et al. 2003). Enfin, il a été établi que les cellules du cancer du cerveau exprimant de hauts niveaux de la protéine BRUCE démontrent une résistance contre le cisplatine et la camptothécine (Chen et al. 1999). Ces résultats prouvent donc que la plupart des IAPs induisent le caractère de résistance chez plusieurs types de cellules cancéreuses. Ainsi, il serait très important de vérifier le pouvoir de chacun d'entre eux dans l'induction de la résistance au cisplatine, à la doxorubicine et au taxol rencontrée chez les cellules du cancer de l'endomètre.

Bien que les résultats obtenus par notre équipe ont démontré que les différents isoformes de la protéine Akt sont impliqués dans la résistance à la doxorubicine et au taxol et que cette protéine induit l'expression de cIAP-1, il serait également très important de vérifier si la résistance aux drogues induite par Akt est en lien avec cIAP-1. De nombreuses études démontrent également que l'activation constitutive de NF- κ B est un élément crucial dans le développement de la résistance aux drogues chez les cellules cancéreuses, car les drogues elles-même ont la capacité d'induire l'activation de NF- κ B (Fahy et al. 2004; Liu et al. 2006; Mabuchi et al. 2004; Venkatraman et al. 2005). De tels résultats nous indiquent que l'analyse des niveaux de NF- κ B, de même que de son activation à la suite des traitements avec les trois différentes drogues étudiées, serait très importante pour expliquer le phénomène de résistance observé chez les cellules KLE.

6.7 L'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines chez les cellules cancéreuses utérines humaines et la résistance aux agents chimiothérapeutiques

Bien que nous avons démontré que la phosphorylation de Akt ainsi que la présence de la protéine inhibitrice d'apoptose XIAP sont impliquées lors de la résistance aux agents chimiothérapeutiques, d'autres types de protéines peuvent également être impliqués dans ce phénomène. Il a été prouvé à plusieurs reprises que la phosphorylation des tyrosines est un mécanisme fondamental chez les eucaryotes et que diverses anomalies survenant à ce niveau peuvent jouer un rôle dans l'apparition des maladies, dont le cancer. Comme il est clairement établi que ce type de phosphorylation est gouverné à la fois par les PTKs et les PTPs, nous nous sommes demandés si l'inhibition

des PTPs, ainsi que des phosphatases alcalines, pouvait jouer un rôle dans la phosphorylation de la protéine Akt ainsi que dans la résistance aux drogues. Nous avons donc traité les cellules ayant la protéine PTEN sauvage, les HeLa et les KLE, de même que la lignée cellulaire Ishikawa qui est reconnue pour avoir la protéine PTEN mutée, avec un cocktail d'inhibiteurs contre les phosphatases tyrosines et alcalines. Les résultats nous ont révélé que chez les cellules HeLa, l'inhibition de diverses phosphatases mène à la phosphorylation de la protéine Akt. Étant donné que les résultats démontrent une diminution de l'isoforme Akt1 et qu'aucune bande contre P-Akt2 n'est observée, il semblerait que cette phosphorylation survienne au niveau de Akt1. Il serait donc important de procéder à une étude par immunoprécipitation afin de conclure une telle affirmation. De plus, nous avons démontré chez cette lignée cellulaire que l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines induit une résistance au taxol. Ces résultats confirment donc ce que nous avons obtenu auparavant à l'aide des transfections; soit que la phosphorylation de Akt conduit à la résistance au taxol chez les cellules HeLa. De plus, nos résultats révèlent que l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines augmente la phosphorylation de Akt1 et/ou Akt3 chez les cellules KLE. Cette élévation des niveaux de phosphorylation de Akt est également accompagnée d'une augmentation de la résistance à la doxorubicine. Étant donné que nos résultats obtenus antérieurement avec les cellules HeLa nous ont révélé qu'une induction de la phosphorylation de Akt2 et Akt3 mène à la résistance à la doxorubicine, il serait important de déterminer quel(s) isoforme(s) est(sont) vraiment phosphorylé(s) en présence de l'inhibiteur chez les cellules KLE. Ainsi, si les résultats démontrent que l'isoforme Akt3 est phosphorylé lors de l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines, cela pourrait expliquer l'augmentation de la résistance à la doxorubicine observée chez les cellules KLE.

La phosphorylation de Akt chez les lignées ayant la protéine PTEN sauvage peut s'expliquer par l'inhibition de diverses tyrosines phosphatases telle que LAR (leucocyte common antigen-related), qui est un «receptor-like» PTP. En fait, il a récemment été démontré que l'inhibition de la fonction biologique de LAR induit l'activation de TrkA et de ses substrats Akt et ERK chez les cellules de neurones PC12 (Xie et al. 2006). Ainsi, il serait important de déterminer la présence de LAR chez les cellules du cancer

de l'endomètre. Il serait également important de vérifier si l'inhibiteur de phosphatases diminue l'activité de LAR et si cette diminution conduit à l'activation de TrkA chez les cellules HeLa et KLE. De plus, il a été démontré que la phosphatase PP2A, une sérine/thréonine phosphatase, est la principale phosphatase déphosphorylant Akt chez les adipocytes de rat (Ugi et al. 2004). L'équipe de Chen et al. (1994) ont également révélé que cette phosphatase peut être inactivée par la phosphorylation de son résidu tyrosine 307 (Chen et al. 1994). Ainsi, il serait important de déterminer si la protéine PP2A est impliquée dans la déphosphorylation de Akt chez les cellules du cancer de l'endomètre et si l'utilisation du cocktail d'inhibiteur de phosphatases tyrosines induit la phosphorylation de la protéine PP2A conduisant ainsi à son inactivation.

Il est important de noter que l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines induit également la diminution de phosphorylation de l'isoforme Akt2 chez les cellules KLE. Une telle diminution peut s'expliquer par l'inhibition de la «non-receptor-like» PTP SHP-2 (Src-homology 2 domain tyrosine phosphatase-2). En fait, il a été démontré que cette tyrosine phosphatase est requise pour l'activation de la voie de signalisation de PI 3-K/Akt par les facteurs de croissance (Wu et al. 2001). De plus, l'équipe de Kwon et al. (2006) a révélé que le recrutement de SHP-2 à la sous-unité p85 de PI 3-K est requis pour que IGF-1 (insulin-like growth factor-1) stimule l'activation de la voie de signalisation de PI 3-K menant à l'activation de Akt (Kwon et al. 2006). Il serait donc important, dans un avenir rapproché, de déterminer les niveaux de SHP-2 chez les cellules KLE et de déterminer si le cocktail d'inhibiteur de phosphatases induit une diminution de l'activité de cette phosphatase chez cette même lignée cellulaire.

Nos résultats révèlent aussi que chez la lignée cellulaire Ishikawa, ayant la protéine PTEN mutée, l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines conduit à la résistance au cisplatine et à la doxorubicine, sans augmentation des niveaux de phosphorylation de Akt. Ces résultats indiquent donc que chez les cellules du cancer de l'endomètre ayant la protéine PTEN mutée, la résistance aux agents chimiothérapeutiques est induite par une autre voie de signalisation que PI 3-K/Akt. Dans ce cas, il serait possible que le récepteur tyrosine kinase DDR1 (discoidin domain

receptor 1) puisse être impliqué dans la résistance au cisplatine et à la doxorubicine chez les cellules Ishikawa (Das et al. 2006). En effet, il a été démontré que DDR1 active NF- κ B, ce qui conduit à une augmentation des niveaux de XIAP et de la cyclooxygénase-2 (COX-2), protéine impliquée dans la synthèse des prostaglandines. Ainsi, une diminution des phosphatases tyrosines pourrait conduire à une augmentation de l'activité de DDR1 et, par conséquent, en une augmentation de la protéine XIAP. Étant donné que nous avons déjà démontré que de hauts niveaux de XIAP induisent la résistance au cisplatine et à la doxorubicine chez les cellules du cancer de l'endomètre, la relation entre DDR1 et XIAP pourrait expliquer la résistance à ces agents chimiothérapeutiques chez les cellules Ishikawa. Ainsi, il serait important de déterminer les niveaux de XIAP chez les cellules Ishikawa à la suite des traitements avec le cocktail d'inhibiteur de phosphatases.

Ces résultats démontrent donc que l'inhibition des phosphatases tyrosines et alcalines chez les cellules cancéreuses utérines humaines peut conduire à une augmentation des niveaux de phosphorylation de Akt ainsi qu'à une résistance à certains agents chimiothérapeutiques. Afin de vérifier que ces effets sont en relation avec le statut du gène suppresseur de tumeur PTEN (sauvage ou muté), il serait important de vérifier avec les lignées HEC-1-A (PTEN sauvage) et les RL-95-2 (PTEN muté) si de tels résultats sont observables. En fait, selon ce que nous avons démontré, nous devrions remarquer une induction de la phosphorylation de Akt chez les cellules HEC-1-A, tandis que cet effet ne devrait pas être observé chez les cellules RL-95-2.

Il est maintenant établi que des altérations dans les niveaux d'expression de ce type de phosphatase sont rencontrées dans certains types de cancers. En fait, il a été démontré par l'équipe de Wiener et al. (1994) que l'expression abondante de la PTP classique PTP1B est présente dans 72,4% des cancers du sein (Wiener et al. 1994). De plus, il a été démontré que des mutations dans le gène de SHP2 sont rencontrées dans 35% des cas de leucémie myélomonocyclique juvénile et lors de certains cancer du poumon et du colon (Mohi et Neel 2007). Au vue du fait que nos résultats démontrent que les phosphatases tyrosines et alcalines semblent impliquées dans la résistance aux

drogues, et qu'il existe de nombreuses PTP, je crois que l'étape suivante pour ce projet serait de cibler certaines phosphatases. Tout d'abord il serait important de pointer du doigt celles qui sont impliquées dans la phosphorylation de Akt, dont SHP1 (Ivanov et al. 2006), PTP 1L (Dromard et al. 2007) et CD45 (Mochizuki et al. 2006) pour ensuite cibler celles qui sont reconnues pour être impliquées dans la résistance aux drogues ou aux ultraviolets. Bien que très peu d'informations sont fournies à l'heure actuelle quant à l'implication des PTP lors de la résistance aux drogues, il existe quelques inhibiteurs de PTP. Parmi ceux-ci notons la présence du PM-20 qui inhibe cdc25A (Kar et al. 2006), le TPY-835 qui inhibe cdc25A et cdc25B (Aoyagi et al. 2005) et un antisense contre le PTP1B (Rondinone et al. 2004). Cependant, malgré l'innovation de nos résultats, beaucoup reste à faire pour élucider le rôle des phosphatases tyrosines et alcalines lors de la résistance aux agents chimiothérapeutiques. Ainsi, lorsque le ciblage de certaines phosphatases impliquées dans la résistance aux drogues sera effectué et que nous pourrons inhiber de façon spécifique celles qui jouent un impact important sur la phosphorylation de Akt, je crois que l'utilisation des inhibiteurs de phosphatases s'avèrera une avenue importante pour le traitement du cancer.

6.8 La liaison 17 β -oestradiol-cisplatine une combinaison gagnante pour les cellules du cancer de l'endomètre résistantes au cisplatine

Nos résultats démontrent que les cellules KLE, exprimant de hauts niveaux des protéines Akt1, Akt2 et Akt3 ainsi que de leur phosphorylation, sont plus résistantes aux agents chimiothérapeutiques tels le cisplatine, la doxorubicine et le taxol que les autres cellules cancéreuses utérines humaines. Cependant, les résultats publiés par notre équipe de recherche en 2004 permettent de constater que la liaison du cisplatine avec le 17 β -oestradiol sensibilise les cellules KLE à cette drogue (Annexe; page 250) (Gagnon et al. 2004). En effet, les résultats démontrent que la liaison du à une molécule de 17 β -oestradiol cisplatine à l'aide d'une longue chaîne de carbone permet de diminuer davantage la prolifération cellulaire des cellules KLE comparé au cisplatine utilisé seul. Lorsque nous évaluons la valeur de IC₅₀ du cisplatine chez les cellules KLE, celle-ci est d'environ 12,5 μ M, tandis que celle pour la molécule 17 β -oestradiol-cisplatine ayant la

plus longue chaîne de carbone entre le cisplatine et le 17β -oestradiol est de $3,5 \mu\text{M}$ (Gagnon et al. 2004). De tels résultats nous révèlent donc que de nouvelles molécules anti-cancéreuses peuvent passer outre les mécanismes de résistance présents chez une lignée cellulaire et qu'il y a espoir pour le futur de trouver des molécules capables de tuer les cellules cancéreuses ayant de hauts niveaux de résistance aux drogues qui sont utilisées à l'heure actuelle pour le traitement du cancer de l'endomètre.

6.9 Conclusion

En résumé, nos résultats démontrent pour la première fois que Akt induit l'expression d'une protéine inhibitrice d'apoptose: cIAP-1. Notre étude nous a également permis de constater que les mécanismes impliqués dans la résistance aux agents chimiothérapeutiques ne sont pas identiques. Tandis que tous les isoformes de Akt sont impliqués dans la résistance au taxol, l'augmentation de la phosphorylation de Akt2 et Akt3 seulement diminue les niveaux d'apoptose induit par la doxorubicine. Cependant, chez les cellules KLE, c'est la diminution des taux de la protéine inhibiteur d'apoptose XIAP qui diminue la résistance au cisplatine et à la doxorubicine. Nous avons également démontré que les phosphatases tyrosines et alcalines régulent l'activation de Akt de façon différente, tout dépendant si la lignée cellulaire étudiée possède ou non la protéine PTEN. Afin de poursuivre les recherches que nous avons entamées, d'autres expériences, en plus de celles déjà discutées, devront être effectuées pour nous permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la résistance aux drogues lors d'un cancer de l'endomètre. Il serait donc important d'analyser si une protéine, en l'occurrence la glycoprotéine-P, peut être impliquée dans la résistance aux trois drogues utilisées lors de cette étude. Chez l'humain, la glycoprotéine-P est codée par une famille de protéines comprenant MDR1 (multi-drug resistance 1) (Chin et al. 1989), qui est reconnue pour induire la résistance aux agents chimiothérapeutiques chez les cellules sensibles, et MDR2 (Van der Bliek et al. 1987; Van der Bliek et al. 1988) qui n'induit pas la résistance aux drogues. La glycoprotéine-P est une pompe à efflux qui induit l'exportation des drogues cytotoxiques à l'extérieur de la cellule, réduisant ainsi les niveaux d'accumulation des différentes drogues, particulièrement les drogues

lipophyles (Fu et al. 2004). L'analyse des niveaux de l'ARNm de MDR1 ainsi que de sa protéine nous a permis de constater que la lignée cellulaire KLE exprime de très hauts niveaux de MDR1 comparativement aux autres lignées du cancer de l'endomètre (résultats non présentés dans cette thèse). Comme il a été reconnu que les cellules exprimant de hauts niveaux de MDR1 sont difficiles à traiter par la chimiothérapie, que les niveaux de l'ARNm de MDR1 chez les tumeurs et les lignées cellulaires semblent corrélés avec le degré de résistance observé (Shen et al. 1986) et que la protéine MDR1 est impliquée dans la résistance à la doxorubicine et au taxol chez les cellules de carcinome hépato-cellulaire (Cheng et al. 2005), il serait donc très intéressant de vérifier si la présence de la protéine MDR1 peut induire la résistance aux drogues lipophiles utilisées pour cette étude, soit la doxorubicine et le taxol chez les cellules KLE. Toutefois, vu que le cisplatine est une drogue hydrophile, nous pensons que MDR1 ne serait pas impliqué dans la résistance à cette drogue. De plus, étant donné qu'il a été démontré que l'activation de Akt mène à l'augmentation de l'expression de MDR1 (Kuo et al. 2002), il serait également intéressant de vérifier si l'activation constitutive de Akt chez les cellules KLE mène à l'expression abondante de MDR1 chez ces mêmes cellules.

Afin d'éliminer la résistance aux agents chimiothérapeutiques, il serait important d'analyser les niveaux des différentes protéines à l'étude chez les femmes souffrant d'un cancer de l'endomètre. Cela permettrait de mieux cibler le traitement de choix et, dans un avenir futur, de personnaliser ce dernier. Ainsi, chez une femme ayant de hauts niveaux de la phosphorylation de Akt, il serait peut-être mieux d'opter pour un traitement au cisplatine afin d'augmenter son taux de réponse. Cependant, si un traitement avec la doxorubicine et le taxol est envisagé, il serait peut-être possible d'utiliser des vecteurs d'expression permettant de diminuer les niveaux de P-Akt, augmentant ainsi ses chances de guérison. Malheureusement, il reste encore beaucoup d'études à réaliser afin de mieux comprendre les mécanismes induisant la résistance aux drogues. Cependant, malgré la résistance aux agents chimiothérapeutiques, il ne faut pas oublier que ce type de traitement sauve de nombreuses vies et permet à des femmes en

âge de se reproduire de guérir de cette terrible maladie tout en gardant l'espoir de pouvoir donner la vie.

BIBLIOGRAPHIE

- Abdul-Ghani, R., Serra, V., Gyorffy, B., Jurchott, K., Solf, A., Dietel, M., and Schafer, R. "The PI3K inhibitor LY294002 blocks drug export from resistant colon carcinoma cells overexpressing MRP1", *Oncogene* 25, 12: 1743-1752, (2006).
- Adey, N. B., Huang, L., Ormonde, P. A., Baumgard, M. L., Pero, R., Byreddy, D. V., Tavtigian, S. V., and Bartel, P. L. "Threonine phosphorylation of the MMAC1/PTEN PDZ binding domain both inhibits and stimulates PDZ binding", *Cancer Res.* 60, 1: 35-37, (2000).
- Aggarwal, S., Ichikawa, H., Takada, Y., Sandur, S. K., Shishodia, S., and Aggarwal, B. B. "Curcumin (diferuloylmethane) down-regulates expression of cell proliferation and antiapoptotic and metastatic gene products through suppression of IkappaBalpha kinase and Akt activation", *Mol. Pharmacol.* 69, 1: 195-206, (2006).
- Akiyama, T. "Wnt/beta-catenin signaling", *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 4: 273-282, (2000).
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. A. "Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1", *EMBO J.* 15, 23: 6541-6551, (1996).
- Alonso, A., Rahmouni, S., Williams, S., van Stipdonk, M., Jaroszewski, L., Godzik, A., Abraham, R. T., Schoenberger, S. P., and Mustelin, T. "Tyrosine phosphorylation of VHR phosphatase by ZAP-70", *Nat. Immunol.* 4, 1: 44-48, (2003).
- Alonso, A., Sasin, J., Bottini, N., Friedberg, I., Friedberg, I., Osterman, A., Godzik, A., Hunter, T., Dixon, J., and Mustelin, T. "Protein tyrosine phosphatases in the human genome", *Cell* 117, 6: 699-711, (2004).
- Altieri, D. C. "Validating survivin as a cancer therapeutic target", *Nat. Rev. Cancer* 3, 1: 46-54, (2003).
- Altomare, D. A., Guo, K., Cheng, J. Q., Sonoda, G., Walsh, K., and Testa, J. R. "Cloning, chromosomal localization and expression analysis of the mouse Akt2 oncogene", *Oncogene* 11, 6: 1055-1060, (1995).
- Amantana, A., London, C. A., Iversen, P. L., and Devi, G. R. "X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibition induces apoptosis and enhances chemotherapy sensitivity in human prostate cancer cells", *Mol. Cancer Ther.* 3, 6: 699-707, (2004).
- Ambrosini, G., Adida, C., and Altieri, D. C. "A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma", *Nat. Med.* 3, 8: 917-921, (1997).

- Ambrosini, G., Adida, C., Sirugo, G., and Altieri, D. C. "Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by survivin gene targeting", *J. Biol. Chem.* 273, 18: 11177-11182, (1998).
- Ame, J. C., Spenlehauer, C., and de Murcia, G. "The PARP superfamily", *Bioessays* 26, 8: 882-893, (2004).
- Andjelkovic, M., Alessi, D. R., Meier, R., Fernandez, A., Lamb, N. J., Frech, M., Cron, P., Cohen, P., Lucocq, J. M., and Hemmings, B. A. "Role of translocation in the activation and function of protein kinase B", *J. Biol. Chem.* 272, 50: 31515-31524, (1997).
- Andre, N., Carre, M., Brasseur, G., Pourroy, B., Kovacic, H., Briand, C., and Braguer, D. "Paclitaxel targets mitochondria upstream of caspase activation in intact human neuroblastoma cells", *FEBS Lett.* 532, 1-2: 256-260, (2002).
- Aoyagi, Y., Masuko, N., Ohkubo, S., Kitade, M., Nagai, K., Okazaki, S., Wierzba, K., Terada, T., Sugimoto, Y., and Yamada, Y. "A novel cinnamic acid derivative that inhibits Cdc25 dual-specificity phosphatase activity", *Cancer Sci.* 96, 9: 614-619, (2005).
- Arboleda, M. J., Lyons, J. F., Kabbinavar, F. F., Bray, M. R., Snow, B. E., Ayala, R., Danino, M., Karlan, B. Y., and Slamon, D. J. "Overexpression of AKT2/protein kinase Bbeta leads to up-regulation of beta1 integrins, increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells", *Cancer Res.* 63, 1: 196-206, (2003).
- Arends, M. J. and Wyllie, A. H. "Apoptosis: mechanisms and roles in pathology", *Int. Rev. Exp. Pathol.* 32, 223-254, (1991).
- Asselin, E., Mills, G. B., and Tsang, B. K. "XIAP regulates Akt activity and Caspase-3-dependent cleavage during cisplatin-induced apoptosis in human ovarian epithelial cancer cells.", *Cancer Res.* 61, 1862-1868, (2001).
- Astrinidis, A. and Henske, E. P. "Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease", *Oncogene Rev.* 24, 50: 7475-7481, (2005).
- Ball, H. G., Blessing, J. A., Lentz, S. S., and Mutch, D. G. "A phase II trial of paclitaxel in patients with advanced or recurrent adenocarcinoma of the endometrium: a Gynecologic Oncology Group study", *Gynecol. Oncol.* 62, 2: 278-281, (1996).
- Banfic, H., Tang, X., Batty, I. H., Downes, C. P., Chen, C., and Rittenhouse, S. E. "A novel integrin-activated pathway forms PKB/Akt-stimulatory phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate via phosphatidylinositol 3-phosphate in platelets", *J. Biol. Chem.* 273, 1: 13-16, (1998).

- Barford, D., Das, A. K., and Egloff, M. P. "The structure and mechanism of protein phosphatases: insights into catalysis and regulation", *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27, 133-164, (1998).
- Bellacosa, A., de Feo, D., Godwin, A. K., Bell, D. W., Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Wan, M., Dubeau, L., Scambia, G., Masciullo, V., Ferrandina, G., Benedetti, Panici P., Mancuso, S., Neri, G., and Testa, J. R. "Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas", *Int. J. Cancer* 64, 4: 280-285, (1995).
- Bellacosa, A., Franke, T. F., Gonzalez-Portal, M. E., Datta, K., Taguchi, T., Gardner, J., Cheng, J. Q., Testa, J. R., and Tsichlis, P. N. "Structure, expression and chromosomal mapping of c-akt: relationship to v-akt and its implications", *Oncogene* 8, 3: 745-754, (1993).
- Bellacosa, A., Kumar, C. C., Di Cristofano, A., and Testa, J. R. "Activation of AKT kinases in cancer: implications for therapeutic targeting", *Adv. Cancer Res.* 94, 29-86, (2005).
- Bellacosa, A., Testa, J. R., Staal, S. P., and Tsichlis, P. N. "A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region", *Science* 254, 5029: 274-277, (1991).
- Bergman, P. J. "Mechanisms of anticancer drug resistance", *Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Proct.* 33, 3: 651-667, (2003).
- Bhalla, K., Huang, Y., Tang, C., Self, S., Ray, S., Mahoney, M. E., Ponnathpur, V., Tourkina, E., Ibrado, A. M., and Bullock, G. "Characterization of a human myeloid leukemia cell line highly resistant to taxol", *Leukemia* 8, 3: 465-475, (1994).
- Bjornsti, M. A. and Houghton, P. J. "Lost in translation: dysregulation of cap-dependent translation and cancer", *Cancer Cell* 5, 6: 519-523, (2004).
- Blagosklonny, M. V., Giannakakou, P., el Deiry, W. S., Kingston, D. G., Higgs, P. I., Neckers, L., and Fojo, T. "Raf-1/bcl-2 phosphorylation: a step from microtubule damage to cell death", *Cancer Res.* 57, 1: 130-135, (1997).
- Blagosklonny, M. V., Schulte, T., Nguyen, P., Trepel, J., and Neckers, L. M. "Taxol-induced apoptosis and phosphorylation of Bcl-2 protein involves c-Raf-1 and represents a novel c-Raf-1 signal transduction pathway", *Cancer Res.* 56, 8: 1851-1854, (1996).
- Boatright, K. M. and Salvesen, G. S. "Mechanisms of caspase activation", *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 6: 725-731, (2003).

- Bogdan, C. and Ding, A. "Taxol, a microtubule-stabilizing antineoplastic agent, induces expression of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 in macrophages", *J. Leukocyte Biol.* 52, 1: 119-121, (1992).
- Bordo, D. and Bork, P. "The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations", *EMBO J.* 3, 8: 741-746, (2002).
- Bottini, N., Bottini, E., Gloria-Bottini, F., and Mustelin, T. "Low-molecular-weight protein tyrosine phosphatase and human disease: in search of biochemical mechanisms", *Arch. Immuno. Ther. Exp.* 50, 95-104, (2002).
- Brognard, J., Clark, A. S., Ni, Y., and Dennis, P. A. "Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation", *Cancer Res.* 61, 10: 3986-3997, (2001).
- Brognard, J., Sieracki, E., Gao, T., and Newton, A. C. "PHLPP and a second isoform, PHLPP2, differentially attenuate the amplitude of Akt signaling by regulating distinct Akt isoforms", *Mol. Cell* 25, 6: 917-931, (2007).
- Burden, D. A. and Osheroff, N. "Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme", *Biochim. Biophys. Acta* 1400, 139-154, (1998).
- Burgering, B. M. and Coffey, P. J. "Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction", *Nature* 376, 6541: 599-602, (1995).
- Burkhart, C. A., Berman, J. W., Swindell, C. S., and Horwitz, S. B. "Relationship between the structure of taxol and other taxanes on induction of tumor necrosis factor-alpha gene expression and cytotoxicity", *Cancer Res.* 54, 22: 5779-5782, (1994).
- Cabral, F. and Barlow, S. B. "Mechanisms by which mammalian cells acquire resistance to drugs that affect microtubule assembly", *FASEB J.* 3, 5: 1593-1599, (1989).
- Cabral, F. R., Brady, R. C., and Schibler, M. J. "A mechanism of cellular resistance to drugs that interfere with microtubule assembly", *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 466, 745-756, (1986).
- Carre, M., Andre, N., Carles, G., Borghi, H., Brichese, L., Briand, C., and Braguer, D. "Tubulin is an inherent component of mitochondrial membranes that interacts with the voltage-dependent anion channel", *J. Biol. Chem.* 277, 37: 33664-33669, (2002).
- Casazza, A. M. and Fairchild, C. R. "Paclitaxel (Taxol): mechanisms of Resistance", *Cancer Treat. Res.* 87, 149-171, (1996).

- Cecconi, F., Alvarez-Bolado, G., Meyer, B. I., Roth, K. A., and Gruss, P. "Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development", *Cell* 94, 6: 727-737, (1998).
- Chai, J., Shiozaki, E., Srinivasula, S. M., Wu, Q., Datta, P., Alnemri, E. S., and Shi, Y. "Structural basis of caspase-7 inhibition by XIAP", *Cell* 104, 5: 769-780, (2001).
- Chen, G. and Zeller, W. J. "Augmentation of cisplatin (DDP) cytotoxicity in vivo by DL-buthionine sulfoximine (BSO) in DDP-sensitive and-resistant rat ovarian tumors and its relation to DNA interstrand cross links", *Anticancer Res.* 11, 6: 2231-2237, (1991).
- Chen, J., Parsons, S., and Brautigan, D. L. "Tyrosine phosphorylation of protein phosphatase 2A in response to growth stimulation and v-src transformation of fibroblasts", *J. Biol. Chem.* 269, 11: 7957-7962, (1994).
- Chen, J., Wu, W., Tahir, S. K., Kroeger, P. E., Rosenberg, S. H., Cowser, L. M., Bennett, F., Krajewski, S., Krajewska, M., Welsh, K., Reed, J. C., and Ng, S. C. "Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth", *Neoplasia*. 2, 3: 235-241, (2000).
- Chen, W. S., Xu, P. Z., Gottlob, K., Chen, M. L., Sokol, K., Shiyanova, T., Roninson, I., Weng, W., Suzuki, R., Tobe, K., Kadowaki, T., and Hay, N. "Growth retardation and increased apoptosis in mice with homozygous disruption of the Akt1 gene", *Genes Dev.* 15, 17: 2203-2208, (2001).
- Chen, Z., Naito, M., Hori, S., Mashima, T., Yamori, T., and Tsuruo, T. "A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 3: 847-854, (1999).
- Chen, Z. S., Mutoh, M., Sumizawa, T., Furukawa, T., Haraguchi, M., Tani, A., Saijo, N., Kondo, T., and Akiyama, S. "An active efflux system for heavy metals in cisplatin-resistant human KB carcinoma cells", *Exp. Cell Res.* 240, 2: 312-320, (1998).
- Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Klein, M. A., Lee, W. C., Kruh, G. D., Lissy, N. A., and Testa, J. R. "Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene: evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis", *Oncogene* 14, 23: 2793-2801, (1997).
- Cheng, J. Q., Godwin, A. K., Bellacosa, A., Taguchi, T., Franke, T. F., Hamilton, T. C., Tsichlis, P. N., and Testa, J. R. "AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 19: 9267-9271, (1992).
- Cheng, J. Q., Ruggeri, B., Klein, W. M., Sonoda, G., Altomare, D. A., Watson, D. K., and Testa, J. R. "Amplification of AKT2 in human pancreatic cells and inhibition

- of AKT2 expression and tumorigenicity by antisense RNA", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 8: 3636-3641, (1996).
- Cheng, S. C., Zhou, J., and Xie, Y. "P-glycoprotein expression induced by glucose depletion enhanced the chemosensitivity in human hepatocellular carcinoma cell-lines", *Cell Biol. Inter.* 29, 4: 269-275, (2005).
- Chin, J. E., Soffir, R., Noonan, K. E., Choi, K., and Roninson, I. B. "Structure and expression of the human MDR (P-glycoprotein) gene family", *Mol Cell Biol* 9, 9: 3808-3820, (1989).
- Cho, H., Mu, J., Kim, J. K., Thorvaldsen, J. L., Chu, Q., Crenshaw, E. B., III, Kaestner, K. H., Bartolomei, M. S., Shulman, G. I., and Birnbaum, M. J. "Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKB beta)", *Science* 292, 5522: 1728-1731, (2001).
- Chung, J. H., Ginn-Pease, M. E., and Eng, C. "Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN) has nuclear localization signal-like sequences for nuclear import mediated by major vault protein", *Cancer Res.* 65, 10: 4108-4116, (2005).
- Chung, J. H., Ostrowski, M. C., Romigh, T., Minaguchi, T., Waite, K. A., and Eng, C. "The ERK1/2 pathway modulates nuclear PTEN-mediated cell cycle arrest by cyclin D1 transcriptional regulation", *Human Molecular Genetics* 15, 17: 2553-2559, (2006).
- Ciccarelli, R. B., Solomon, M. J., Varshavsky, A., and Lippard, S. J. "In vivo effects of cis- and trans-diamminedichloroplatinum(II) on SV40 chromosomes: differential repair, DNA-protein cross-linking, and inhibition of replication", *Biochemistry* 24, 26: 7533-7540, (1985).
- Clark, A. S., West, K., Streicher, S., and Dennis, P. A. "Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells", *Mol. Cancer Ther.* 1, 9: 707-717, (2002).
- Coffer, P. J., Jin, J., and Woodgett, J. R. "Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation", *Biochem. J.* 335, Pt 1: 1-13, (1998).
- Cohen, G. M. "Caspases: the executioners of apoptosis", *Biochem. J.* 326, Pt 1: 1-16, (1997a).
- Cohen, P. T. "Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life", *Trends Biochem. Sci.* 22, 7: 245-251, (1997b).
- Cowen, D. S., Sowers, R. S., and Manning, D. R. "Activation of a mitogen-activated protein kinase (ERK2) by the 5-hydroxytryptamine1A receptor is sensitive not

- only to inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase, but to an inhibitor of phosphatidylcholine hydrolysis", *J Biol Chem* 271, 37: 22297-22300, (1996).
- Creagh, E. M. and Martin, S. J. "Caspases: cellular demolition experts", *Biochem. Soc. Trans.* 29, Pt 6: 696-702, (2001).
- Crnkovic-Mertens, I., Hoppe-Seyler, F., and Butz, K. "Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene", *Oncogene* 22, 51: 8330-8336, (2003).
- Cryns, V. and Yuan, J. "Proteases to die for", *Gene Dev.* 12, 11: 1551-1570, (1998).
- Cullinane, C. and Phillips, D. R. "Induction of stable transcriptional blockage sites by adriamycin: GpC specificity of apparent adriamycin-DNA adducts and dependence on iron(III) ions", *Biochemistry* 29, 23: 5638-5646, (1990).
- Cutts, S. M., Nudelman, A., Rephaeli, A., and Phillips, D. R. "The power and potential of doxorubicin-DNA adducts", *IUBMB Life* 57, 2: 73-81, (2005a).
- Cutts, S. M., Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., and Phillips, D. R. "Recent advances in understanding and exploiting the activation of anthracyclines by formaldehyde", *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* 5, 431-447, (2005b).
- Damon, A. "Host factors in cancer of the breast and uterine cervix and corpus", *J. Natl. Cancer Inst.* 24, 483-516, (1960).
- Dan, H. C., Sun, M., Kaneko, S., Feldman, R. I., Nicosia, S. V., Wang, H. G., Tsang, B. K., and Cheng, J. Q. "Akt phosphorylation and stabilization of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)", *J. Biol. Chem.* 279, 7: 5405-5412, (2004).
- Das, S., Dixon, J. E., and Cho, W. "Membrane-binding and activation mechanism of PTEN", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 13: 7491-7496, (2003).
- Das, S., Ongusaha, P. P., Yang, Y. S., Park, J. M., Aaronson, S. A., and Lee, S. W. "Discoidin domain receptor 1 receptor tyrosine kinase induces cyclooxygenase-2 and promotes chemoresistance through nuclear factor- κ B pathway activation", *Cancer Res.* 66, 16: 8123-8130, (2006).
- Datta, K., Bellacosa, A., Chan, T. O., and Tsichlis, P. N. "Akt is a direct target of the phosphatidylinositol 3-kinase. Activation by growth factors, v-src and v-Ha-ras, in Sf9 and mammalian cells", *J. Biol. Chem.* 271, 48: 30835-30839, (1996).
- Davies, M. A., Koul, D., Dhesi, H., Berman, R., McDonnell, T. J., McConkey, D., Yung, W. K., and Steck, P. A. "Regulation of Akt/PKB activity, cellular growth, and apoptosis in prostate carcinoma cells by MMAC/PTEN.", *Cancer Res.* 59, 11: 2551-2556, (1999).

- Davies, S. P., Reddy, H., Caivano, M., and Cohen, P. "Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors", *Biochem. J.* 351, Pt 1: 95-105, (2000).
- De Brabander, M., Bulinski, J. C., Geuens, G., De Mey, J., and Borisy, G. G. "Immunoelectron microscopic localization of the 210,000-mol wt microtubule-associated protein in cultured cells of primates", *J. Cell Biol.* 91, 2 Pt 1: 438-445, (1981).
- DeFeo-Jones, D., Barnett, S. F., Fu, S., Hancock, P. J., Haskell, K. M., Leander, K. R., McAvoy, E., Robinson, R. G., Duggan, M. E., Lindsley, C. W., Zhao, Z., Huber, H. E., and Jones, R. E. "Tumor cell sensitization to apoptotic stimuli by selective inhibition of specific Akt/PKB family members", *Mol. Cancer Ther.* 4, 2: 271-279, (2005).
- Delcommenne, M., Tan, C., Gray, V., Rue, L., Woodgett, J., and Dedhar, S. "Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 19: 11211-11216, (1998).
- Deligdisch, L. and Holinka, C. F. "Endometrial carcinoma: two diseases?", *Cancer Detect. Prev.* 10, 3-4: 237-246, (1987).
- Deppe, G., Cohen, C. J., and Bruckner, H. W. "Treatment of advanced endometrial adenocarcinoma with cis-dichlorodiammine platinum(II) after intensive prior therapy", *Gynecol. Oncol.* 10, 1: 51-54, (1980).
- Dery, M. C., Leblanc, V., Shooner, C., and Asselin, E. "Regulation of Akt expression and phosphorylation by 17beta-estradiol in the rat uterus during estrous cycle", *Reprod. Biol. Endocrinol.* 1, 1: 47-, (2003).
- Deveraux, Q. L., Leo, E., Stennicke, H. R., Welsh, K., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases", *EMBO J.* 18, 19: 5242-5251, (1999).
- Deveraux, Q. L., Roy, N., Stennicke, H. R., Van, Arsdale T., Zhou, Q., Srinivasula, S. M., Alnemri, E. S., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases.", *EMBO J.* 17, 8: 2215-2223, (1998).
- Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases.", *Nature* 388, 6639: 300-304, (1997).
- Dhand, R., Hara, K., Hiles, I., Bax, B., Gout, I., Panayotou, G., Fry, M. J., Yonezawa, K., Kasuga, M., and Waterfield, M. D. "PI 3-kinase: structural and functional analysis of intersubunit interactions", *EMBO J.* 13, 3: 511-521, (1994).

- Di Marco, A., Silvestrini, R., Di Marco, S., and Dasdia, T. "Inhibiting effect of the new cytotoxic antibiotic daunomycin on nucleic acids and mitotic activity of HeLa cells", *J. Cell Biol.* 27, 3: 545-550, (1965).
- Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 20: 9363-9367, (1995).
- Ding, A. H., Porteu, F., Sanchez, E., and Nathan, C. F. "Shared actions of endotoxin and taxol on TNF receptors and TNF release", *Science* 248, 4953: 370-372, (1990).
- DiPaolo, C. J. and Rival, J. "Acid phosphatase: clinical utility of the first tumor marker", *Henry Ford Hosp. Med. J.* 30, 2: 70-76, (1982).
- Domin, J., Pages, F., Volinia, S., Rittenhouse, S. E., Zvelebil, M. J., Stein, R. C., and Waterfield, M. D. "Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin", *Biochem. J.* 326, Pt 1: 139-147, (1997).
- Downward, J. "PI 3-kinase, Akt and cell survival", *Semin. Cell. Dev. Biol.* 15, 2: 177-182, (2004).
- Dromard, M., Bompard, G., Glondou-Lassis, M., Puech, C., Chalbos, D., and Freiss, G. "The putative tumor suppressor gene PTPN13/PTPL1 induces apoptosis through insulin receptor substrate-1 dephosphorylation", *Cancer Res.* 67, 14: 6806-6813, (2007).
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition", *Cell* 102, 1: 33-42, (2000).
- Dunphy, W. G. and Newport, J. W. "Fission yeast p13 blocks mitotic activation and tyrosine dephosphorylation of the *Xenopus* cdc2 protein kinase", *Cell* 58, 1: 181-191, (1989).
- Eastman, A. "Cross-linking of glutathione to DNA by cancer chemotherapeutic platinum coordination complexes", *Chem. Biol. Interact.* 61, 3: 241-248, (1987).
- Easton, R. M., Cho, H., Roovers, K., Shineman, D. W., Mizrahi, M., Forman, M. S., Lee, V. M., Szabolcs, M., de Jong, R., Oltersdorf, T., Ludwig, T., Efstratiadis, A., and Birnbaum, M. J. "Role for Akt3/protein kinase Bgamma in attainment of normal brain size", *Mol. Cell Biol.* 25, 5: 1869-1878, (2005).
- Eliopoulos, A. G., Kerr, D. J., Herod, J., Hodgkins, L., Krajewski, S., Reed, J. C., and Young, L. S. "The control of apoptosis and drug resistance in ovarian cancer: influence of p53 and Bcl-2", *Oncogene* 11, 7: 1217-1228, (1995).

- Emran, M. A., Rebbaa, A., and Mirkin, B. L. "Doxorubicin resistant neuroblastoma cells secrete factors that activate AKT and attenuate cytotoxicity in drug-sensitive cells", *Cancer Lett.* 182, 1: 53-59, (2002).
- Eng, C. "Genetics of Cowden syndrome: through the looking glass of oncology", *Int. J. Oncol.* 12, 3: 701-710, (1998).
- Engstrom, L. "Incorporation of inorganic phosphate into alkaline phosphatase from *Escherichia coli*", *Biochim. Biophys. Acta* 56, 606: (1962).
- Enomoto, T., Fujita, M., Inoue, M., Rice, J. M., Nakajima, R., Tanizawa, O., and Nomura, T. "Alterations of the p53 tumor suppressor gene and its association with activation of the c-K-ras-2 protooncogene in premalignant and malignant lesions of the human uterine endometrium", *Cancer Res.* 53, 8: 1883-1888, (1993).
- Erl, W., Hansson, G. K., de, Martin R., Draude, G., Weber, K. S., and Weber, C. "Nuclear factor-kappa B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells.", *Circ. Res.* 84, 6: 668-677, (1999).
- Escobedo, J. A., Navankasattusas, S., Kavanaugh, W. M., Milfay, D., Fried, V. A., and Williams, L. T. "cDNA cloning of a novel 85 kd protein that has SH2 domains and regulates binding of PI 3-kinase to the PDGF beta-receptor", *Cell* 65, 1: 75-82, (1991).
- Esteller, M., Xercavins, J., and Reventos, J. "Advances in the molecular genetics of endometrial cancer (Review).", *Oncol. Rep.* 6, 6: 1377-1382, (1999).
- Eves, E. M., Xiong, W., Bellacosa, A., Kennedy, S. G., Tsichlis, P. N., Rosner, M. R., and Hay, N. "Akt, a target of phosphatidylinositol 3-kinase, inhibits apoptosis in a differentiating neuronal cell line.", *Mol. Cell Biol.* 18, 4: 2143-2152, (1998).
- Fahy, B. N., Schlieman, M. G., Virudachalam, S., and Bold, R. J. "Inhibition of AKT abrogates chemotherapy-induced NF-kappaB survival mechanisms: implications for therapy in pancreatic cancer", *J. Am. Coll. Surg.* 198, 4: 591-599, (2004).
- Fajac, A., Da Silva, J., Ahomadegbe, J. C., Rateau, J. G., Bernaudin, J. F., Riou, G., and Benard, J. "Cisplatin-induced apoptosis and p53 gene status in a cisplatin-resistant human ovarian carcinoma cell line", *Int. J. Cancer* 68, 1: 67-74, (1996).
- Fan, W. "Possible mechanisms of paclitaxel-induced apoptosis", *Biochem. Pharmacol.* 57, 11: 1215-1221, (1999).
- Feinstein, E., Canaani, E., and Weiner, L. M. "Dependence of nucleic acid degradation on in situ free-radical production by adriamycin", *Biochemistry* 32, 48: 13156-13161, (1993).

- Feng, J., Park, J., Cron, P., Hess, D., and Hemmings, B. A. "Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase", *J. Biol. Chem.* 279, 39: 41189-41196, (2004).
- Ferlini, C., Raspaglio, G., Mozzetti, S., Distefano, M., Filippetti, F., Martinelli, E., Ferrandina, G., Gallo, D., Ranelletti, F. O., and Scambia, G. "Bcl-2 down-regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance", *Mol. Pharmacol.* 64, 1: 51-58, (2003).
- Figuerola-Masot, X. A., Hetman, M., Higgins, M. J., Kokot, N., and Xia, Z. "Taxol induces apoptosis in cortical neurons by a mechanism independent of Bcl-2 phosphorylation", *J. Neurosci.* 21, 13: 4657-4667, (2001).
- Fleming, G. F., Brunetto, V. L., Cella, D., Look, K. Y., Reid, G. C., Munkarah, A. R., Kline, R., Burger, R. A., Goodman, A., and Burks, R. T. "Phase III trial of doxorubicin plus cisplatin with or without paclitaxel plus filgrastim in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study", *J. Clin. Oncol.* 22, 11: 2159-2166, (2004).
- Flusberg, D. A., Numaguchi, Y., and Ingber, D. E. "Cooperative control of Akt phosphorylation, bcl-2 expression, and apoptosis by cytoskeletal microfilaments and microtubules in capillary endothelial cells", *Mol. Biol. Cell* 12, 10: 3087-3094, (2001).
- Fox, H. and Sen, D. K. "A controlled study of the constitutional stigmata of endometrial adenocarcinoma", *Br. J. Cancer* 24, 1: 30-36, (1970).
- Franke, T. F., Yang, S. I., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., and Tsichlis, P. N. "The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase", *Cell* 81, 5: 727-736, (1995).
- Franklin, C. C. and Kraft, A. S. "Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells", *J. Biol. Chem.* 272, 27: 16917-16923, (1997).
- Fu, L., Liang, Y., Deng, L., Ding, Y., Chen, L., Ye, Y., Yang, X., and Pan, Q. "Characterization of tetrandrine, a potent inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance", *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53, 4: 349-356, (2004).
- Gagnon, V., St Germain, M. E., Descoteaux, C., Provencher-Mandeville, J., Parent, S., Mandal, S. K., Asselin, E., and Berube, G. "Biological evaluation of novel estrogen-platinum(II) hybrid molecules on uterine and ovarian cancers-molecular modeling studies", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 23: 5919-5924, (2004).

- Gandy, J. C., Rountree, A. E., and Bijur, G. N. "Akt1 is dynamically modified with O-GlcNAc following treatments with PUGNAc and insulin-like growth factor-1", *FEBS Lett.* 580, 13: 3051-3058, (2006).
- Gao, G. and Dou, Q. P. "G(1) phase-dependent expression of bcl-2 mRNA and protein correlates with chemoresistance of human cancer cells", *Mol. Pharmacol.* 58, 5: 1001-1010, (2000).
- Gao, T., Furnari, F., and Newton, A. C. "PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth", *Mol. Cell* 18, 1: 13-24, (2005).
- Gazitt, Y., Rothenberg, M. L., Hilsenbeck, S. G., Fey, V., Thomas, C., and Montegomrey, W. "Bcl-2 overexpression is associated with resistance to paclitaxel, but not gemcitabine, in multiple myeloma cells", *Int. J. Oncol.* 13, 4: 839-848, (1998).
- Gelfanov, V. M., Burgess, G. S., Litz-Jackson, S., King, A. J., Marshall, M. S., Nakshatri, H., and Boswell, H. S. "Transformation of interleukin-3-dependent cells without participation of Stat5/bcl-xL: cooperation of akt with raf/erk leads to p65 nuclear factor kappaB-mediated antiapoptosis involving c-IAP2", *Blood* 98, 8: 2508-2517, (2001).
- Gewirtz, D. A. "A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin", *Biochem. Pharmacol.* 57, 7: 727-741, (1999).
- Ghosh, S. S., Bock, S. C., Rokita, S. E., and Kaiser, E. T. "Modification of the active site of alkaline phosphatase by site-directed mutagenesis", *Science* 231, 4734: 145-148, (1986).
- Giannakakou, P., Nakano, M., Nicolaou, K. C., O'Brate, A., Yu, J., Blagosklonny, M. V., Greber, U. F., and Fojo, T. "Enhanced microtubule-dependent trafficking and p53 nuclear accumulation by suppression of microtubule dynamics", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 16: 10855-10860, (2002).
- Giodini, A., Kallio, M. J., Wall, N. R., Gorbsky, G. J., Tognin, S., Marchisio, P. C., Symons, M., and Altieri, D. C. "Regulation of microtubule stability and mitotic progression by survivin", *Cancer Res.* 62, 9: 2462-2467, (2002).
- Godwin, A. K., Meister, A., O'Dwyer, P. J., Huang, C. S., Hamilton, T. C., and Anderson, M. E. "High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7: 3070-3074, (1992).
- Gould, K. L. and Nurse, P. "Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis", *Nature* 342, 6245: 39-45, (1989).

- Green, D. R. and Reed, J. C. "Mitochondria and apoptosis", *Science*. 281, 5381: 1309-1312, (1998).
- Grossman, D., McNiff, J. M., Li, F., and Altieri, D. C. "Expression of the apoptosis inhibitor, survivin, in nonmelanoma skin cancer and gene targeting in a keratinocyte cell line", *Lab. Invest.* 79, 9: 1121-1126, (1999).
- Gruss, H. J. and Dower, S. K. "Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas", *Blood* 85, 12: 3378-3404, (1995).
- Guan, K. L. and Dixon, J. E. "Evidence for protein-tyrosine-phosphatase catalysis proceeding via a cysteine-phosphate intermediate", *J. Biol. Chem.* 266, 26: 17026-17030, (1991).
- Guzeloglu, Kayisli O., Kayisli, U. A., Luleci, G., and Arici, A. "In vivo and in vitro regulation of Akt activation in human endometrial cells is estrogen dependent", *Biol. Reprod.* 71, 3: 714-721, (2004).
- Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., de la Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., and Mak, T. W. "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo", *Cell* 94, 3: 339-352, (1998).
- Haldar, S., Chintapalli, J., and Croce, C. M. "Taxol induces bcl-2 phosphorylation and death of prostate cancer cells", *Cancer Res.* 56, 6: 1253-1255, (1996).
- Hale, G. E., Hughes, C. L., and Cline, J. M. "Endometrial cancer: hormonal factors, the perimenopausal "window of risk," and isoflavones", *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 1: 3-15, (2002).
- Hao, Y., Sekine, K., Kawabata, A., Nakamura, H., Ishioka, T., Ohata, H., Katayama, R., Hashimoto, C., Zhang, X., Noda, T., Tsuruo, T., and Naito, M. "Apollon ubiquitinates SMAC and caspase-9, and has an essential cytoprotection function", *Nat. Cell Biol.* 6, 9: 849-860, (2004).
- Hauser, H. P., Bardroff, M., Pyrowolakis, G., and Jentsch, S. "A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors", *J. Biol. Chem.* 273, 6: 1415-1422, (1998).
- Hays, R., Wickline, L., and Cagan, R. "Morgue mediates apoptosis in the *Drosophila melanogaster* retina by promoting degradation of DIAP1", *Nat. Cell Biol.* 4, 6: 425-431, (2002).
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Datta, P., Madesh, M., Wassell, R., Zhang, Z., Cheong, N., Nejme, J., Fernandes-Alnemri, T., Hoshino, S., and Alnemri, E. S. "The polypeptide chain-releasing factor GSPT1/eRF3 is proteolytically processed into an IAP-binding protein", *J. Biol. Chem.* 278, 40: 38699-38706, (2003).

- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. "Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction", *J. Biol. Chem.* 277, 1: 432-438, (2002).
- Hengartner, M. O. and Horvitz, H. R. "Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*", *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 4: 581-586, (1994).
- Henneberry, M. O., Engel, G., and Grayhack, J. T. "Acid phosphatase", *Urol. Clin. North. Am.* 6, 3: 629-641, (1979).
- Hiebert, S. W., Lipp, M., and Nevins, J. R. "E1A-dependent trans-activation of the human MYC promoter is mediated by the E2F factor", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 10: 3594-3598, (1989).
- Hiles, I. D., Otsu, M., Volinia, S., Fry, M. J., Gout, I., Dhand, R., Panayotou, G., Ruiz-Larrea, F., Thompson, A., and Totty, N. F. "Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit", *Cell* 70, 3: 419-429, (1992).
- Hiramatsu, H. P., Kikuchi, Y., Seto, H., and Nagata, I. "In vitro sensitivity of human endometrial cancer cell lines to paclitaxel or irinotecan (CPT-11) in combination with other anticancer drugs", *Anticancer Drugs* 11, 7: 573-578, (2000).
- Hisamoto, K., Ohmichi, M., Kurachi, H., Hayakawa, J., Kanda, Y., Nishio, Y., Adachi, K., Tasaka, K., Miyoshi, E., Fujiwara, N., Taniguchi, N., and Murata, Y. "Estrogen induces the Akt-dependent activation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells", *J. Biol. Chem.* 276, 5: 3459-3467, (2001).
- Hockenbery, D. M. "bcl-2 in cancer, development and apoptosis", *J. Cell Sci.* 18, 51-55, (1994).
- Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R. G., and Chow, T. "Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death", *Oncogene* 19, 36: 4174-4177, (2000).
- Holinka, C. F. and Finch, C. E. "Age-related changes in the decidual response of the C57BL/6J mouse uterus", *Biol. Reprod.* 16, 3: 385-393, (1977).
- Holinka, C. F. and Gurpide, E. "In vivo effects of estetrol on the immature rat uterus", *Biol. Reprod.* 20, 2: 242-246, (1979).
- Holinka, C. F., Hetland, M. D., and Finch, C. E. "The response to a single dose of estradiol in the uterus of ovariectomized C57BL/6J mice during aging", *Biol. Reprod.* 17, 2: 262-264, (1977).

- Holley, C. L., Olson, M. R., Colon-Ramos, D. A., and Kornbluth, S. "Reaper eliminates IAP proteins through stimulated IAP degradation and generalized translational inhibition", *Nat. Cell Biol.* 4, 6: 439-444, (2002).
- Holt, K. H., Olson, L., Moye-Rowley, W. S., and Pessin, J. E. "Phosphatidylinositol 3-kinase activation is mediated by high-affinity interactions between distinct domains within the p110 and p85 subunits", *Mol. Cell Biol.* 14, 1: 42-49, (1994).
- Honda, R., Ohba, Y., Nagata, A., Okayama, H., and Yasuda, H. "Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase", *FEBS Lett.* 318, 3: 331-334, (1993).
- Horwitz, S. B., Cohen, D., Rao, S., Ringel, I., Shen, H. J., and Yang, C. P. "Taxol: mechanisms of action and resistance", *J. Natl. Cancer Inst.* 15, 15: 55-61, (1993).
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., and Exton, J. H. "Critical role of endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK pathways in counteracting endoplasmic reticulum stress-induced cell death", *J. Biol. Chem.* 19;279, 47: 49420-49429, (2004).
- Hu, P., Mondino, A., Skolnik, E. Y., and Schlessinger, J. "Cloning of a novel, ubiquitously expressed human phosphatidylinositol 3-kinase and identification of its binding site on p85", *Mol. Cell Biol.* 13, 12: 7677-7688, (1993).
- Hu, Y., Benedict, M. A., Ding, L., and Nunez, G. "Role of cytochrome c and dATP/ATP hydrolysis in Apaf-1-mediated caspase-9 activation and apoptosis", *EMBO J.* 18, 13: 3586-3595, (1999).
- Hu, Y., Cherton-Horvat, G., Dragowska, V., Baird, S., Korneluk, R. G., Durkin, J. P., Mayer, L. D., and LaCasse, E. C. "Antisense oligonucleotides targeting XIAP induce apoptosis and enhance chemotherapeutic activity against human lung cancer cells in vitro and in vivo", *Clin. Cancer Res.* 9, 7: 2826-2836, (2003).
- Hu, Y., Ding, L., Spencer, D. M., and Nunez, G. "WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation", *J. Biol. Chem.* 273, 50: 33489-33494, (1998).
- Huang, H., Cheville, J. C., Pan, Y., Roche, P. C., Schmidt, L. J., and Tindall, D. J. "PTEN induces chemosensitivity in PTEN-mutated prostate cancer cells by suppression of Bcl-2 expression", *J. Biol. Chem.* 276, 42: 38830-38836, (2001).
- Huber, A., Bai, P., Murcia, J. M., and Murcia, G. "PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development", *DNA Repair (Amst)* 3, 8-9: 1103-1108, (2004).
- Hunter, T. "A thousand and one protein kinases", *Cell* 50, 6: 823-829, (1987).
- Hwang, S. G., Ryu, J. H., Kim, I. C., Jho, E. H., Jung, H. C., Kim, K., Kim, S. J., and Chun, J. S. "Wnt-7a causes loss of differentiated phenotype and inhibits

- apoptosis of articular chondrocytes via different mechanisms", *J. Biol. Chem.* 279, 25: 26597-26604, (2004).
- Inukai, K., Anai, M., Van Breda, E., Hosaka, T., Katagiri, H., Funaki, M., Fukushima, Y., Ogihara, T., Yazaki, Y., Kikuchi, Oka, Y., and Asano, T. "A novel 55-kDa regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85alpha gene", *J. Biol. Chem.* 271, 10: 5317-5320, (1996).
- Inukai, K., Funaki, M., Ogihara, T., Katagiri, H., Kanda, A., Anai, M., Fukushima, Y., Hosaka, T., Suzuki, M., Shin, B. C., Takata, K., Yazaki, Y., Kikuchi, M., Oka, Y., and Asano, T. "p85alpha gene generates three isoforms of regulatory subunit for phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-Kinase), p50alpha, p55alpha, and p85alpha, with different PI 3-kinase activity elevating responses to insulin", *J. Biol. Chem.* 272, 12: 7873-7882, (1997).
- Ishikawa, T. "The ATP-dependent glutathione S-conjugate export pump", *Trends Biochem. Sci.* 17, 11: 463-468, (1992).
- Ishikawa, T. and Ali-Osman, F. "Glutathione-associated cis-diamminedichloroplatinum(II) metabolism and ATP-dependent efflux from leukemia cells. Molecular characterization of glutathione-platinum complex and its biological significance", *J. Biol. Chem.* 268, 27: 20116-29125, (1993).
- Ivanov, V. N., Ronai, Z., and Hei, T. K. "Opposite roles of FAP-1 and dynamin in the regulation of Fas (CD95) translocation to the cell surface and susceptibility to Fas ligand-mediated apoptosis", *J. Biol. Chem.* 281, 3: 1840-1852, (2006).
- Jacobson, M. D. "Apoptosis: Bcl-2-related proteins get connected", *Curr. Biol.* 7, 5: R277-R281, (1997).
- Jimenez, C., Jones, D. R., Rodriguez-Viciana, P., Gonzalez-Garcia, A., Leonardo, E., Wennstrom, S., von Kobbe, C., Toran, J. L., Borlado, L., Calvo, V., Copin, S. G., Albar, J. P., Gaspar, M. L., Diez, E., Marcos, M. A., Downward, J., Martinez, A., Merida, I., and Carrera, A. C. "Identification and characterization of a new oncogene derived from the regulatory subunit of phosphoinositide 3-kinase", *EMBO J.* 17, 3: 743-753, (1998).
- Jin, W., Wu, L., Liang, K., Liu, B., Lu, Y., and Fan, Z. "Roles of the PI-3K and MEK pathways in Ras-mediated chemoresistance in breast cancer cells", *Br. J. Cancer* 89, 1: 185-191, (2003).
- Jin, X., Gossett, D. R., Wang, S., Yang, D., Cao, Y., Chen, J., Guo, R., Reynolds, R. K., and Lin, J. "Inhibition of AKT survival pathway by a small molecule inhibitor in human endometrial cancer cells", *Br. J. Cancer* 91, 10: 1808-1812, (2004).
- Jones, P. F., Jakubowicz, T., and Hemmings, B. A. "Molecular cloning of a second form of rac protein kinase", *Cell Regul.* 2, 12: 1001-1009, (1991).

- Jordan, M. A., Toso, R. J., Thrower, D., and Wilson, L. "Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 20: 9552-9556, (1993).
- Jordan, M. A., Wendell, K., Gardiner, S., Derry, W. B., Copp, H., and Wilson, L. "Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death", *Cancer Res.* 56, 4: 816-825, (1996).
- Kamijo, T., Zindy, F., Roussel, M. F., Quelle, D. E., Downing, J. R., Ashmun, R. A., Grosveld, G., and Sherr, C. J. "Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF", *Cell* 91, 5: 649-659, (1997).
- Kane, L. P., Shapiro, V. S., Stokoe, D., and Weiss, A. "Induction of NF-kappaB by the Akt/PKB kinase", *Curr. Biol.* 9, 11: 601-604, (1999).
- Kaneko, S., Feldman, R. I., Yu, L., Wu, Z., Gritsko, T., Shelley, S. A., Nicosia, S. V., Nobori, T., and Cheng, J. Q. "Positive feedback regulation between Akt2 and MyoD during muscle differentiation. Cloning of Akt2 promoter", *J. Biol. Chem.* 277, 26: 23230-23235, (2002).
- Kapeller, R. and Cantley, L. C. "Phosphatidylinositol 3-kinase", *Bioessays* 16, 8: 565-576, (1994).
- Kaplan, M. M. "Alkaline phosphatase", *N. Engl. J. Med.* 286, 4: 200-202, (1972).
- Kar, S., Wang, M., Yao, W., Michejda, C. J., and Carr, B. I. "PM-20, a novel inhibitor of Cdc25A, induces extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and inhibits hepatocellular carcinoma growth in vitro and in vivo", *Mol. Cancer Ther.* 5, 6: 1511-1519, (2006).
- Kartalou, M. and Essigmann, J. M. "Mechanisms of resistance to cisplatin", *Mutat. Res.* 478, 1-2: 23-43, (2001).
- Kasof, G. M. and Gomes, B. C. "Livin, a novel inhibitor of apoptosis protein family member", *J. Biol. Chem.* 276, 5: 3238-3246, (2001).
- Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., and Waterfield, M. D. "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer", *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 615-675, (2001).
- Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. "Induction of apoptosis by cancer chemotherapy", *Exp. Cell Res.* 256, 1: 42-49, (2000).
- Kavallaris, M., Kuo, D. Y., Burkhart, C. A., Regl, D. L., Norris, M. D., Haber, M., and Horwitz, S. B. "Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with

- altered expression of specific beta-tubulin isotypes", *J. Clin. Invest.* 100, 5: 1282-1293, (1997).
- Kawasaki, H., Altieri, D. C., Lu, C. D., Toyoda, M., Tenjo, T., and Tanigawa, N. "Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer", *Cancer Res.* 58, 22: 5071-5074, (1998).
- Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K., and Hay, N. "Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria", *Mol. Cell Biol.* 19, 8: 5800-5810, (1999).
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics", *Br. J. Cancer* 26, 4: 239-257, (1972).
- Keyse, S. M. "Protein phosphatases and the regulation of MAP kinase activity", *Semin. Cell. Dev. Biol.* 9, 2: 143-152, (1998).
- Kim, R. "Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy", *Cancer* 103, 8: 1551-1560, (2005).
- Kim, S. E., Lee, W. J., and Choi, K. Y. "The PI3 kinase-Akt pathway mediates Wnt3a-induced proliferation", *Cell Signal. Cell*, (2006).
- Klippel, A., Escobedo, J. A., Hirano, M., and Williams, L. T. "The interaction of small domains between the subunits of phosphatidylinositol 3-kinase determines enzyme activity", *Mol. Cell Biol.* 14, 4: 2675-2685, (1994).
- Klos, K. S., Zhou, X., Lee, S., Zhang, L., Yang, W., Nagata, Y., and Yu, D. "Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone", *Cancer* 98, 7: 1377-1385, (2003).
- Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M., Mills, G. B., Mendelsohn, J., and Fan, Z. "HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells", *Oncogene* 22, 21: 3205-3212, (2003).
- Kodaki, T., Woscholski, R., Hallberg, B., Rodriguez-Viciano, P., Downward, J., and Parker, P. J. "The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras", *Curr. Biol.* 4, 9: 798-806, (1994).
- Konishi, H., Kuroda, S., Tanaka, M., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kameyama, K., Haga, T., and Kikkawa, U. "Molecular cloning and characterization of a new member of the RAC protein kinase family: association of the pleckstrin homology domain of three types of RAC protein kinase with protein kinase C subspecies and beta gamma subunits of G proteins", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 216, 2: 526-534, (1995).

- Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Ono, Y., Tokunaga, C., Kuroda, S., and Kikkawa, U. "Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 15: 7639-7643, (1996).
- Kroemer, G. "The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis", *Nat. Med.* 3, 6: 614-620, (1997).
- Kufe, D., Polloch, R., Weichselbaum, R., Bast, R., Gansler, T., Holland, J. and Frei, E. "Cancer medicine 6" 6e édition, BC Decker Inc., Hamilton, Canada: 2764 pages (2003).
- Kuida, K., Haydar, T. F., Kuan, C. Y., Gu, Y., Taya, C., Karasuyama, H., Su, M. S., Rakic, P., and Flavell, R. A. "Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9", *Cell* 94, 3: 325-337, (1998).
- Kumar, N. "Taxol-induced polymerization of purified tubulin. Mechanism of action", *J. Biol. Chem.* 256, 20: 10435-10441, (1981).
- Kuo, D. Y., Mallick, S., Shen, H. J., DeVictoria, C., Jones, J., Fields, A. L., Goldberg, G. L., Runowicz, C. D., and Horwitz, S. B. "Analysis of MDR1 expression in normal and malignant endometrium by reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemistry", *J. Clin. Cancer Res.* 2, 12: 1981-1992, (1996).
- Kuo, M. T., Liu, Z., Wei, Y., Lin-Lee, Y. C., Tatebe, S., Mills, G. B., and Unate, H. "Induction of human MDR1 gene expression by 2-acetylaminofluorene is mediated by effectors of the phosphoinositide 3-kinase pathway that activate NF-kappaB signaling", *Oncogene* 21, 13: 1945-1954, (2002).
- Kwon, M., Ling, Y., Maile, L. A., Badley-Clark, J., and Clemmons, D. R. "Recruitment of the tyrosine phosphatase Src homology 2 domain tyrosine phosphatase-2 to the p85 subunit of phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase is required for insulin-like growth factor-I-dependent PI-3 kinase activation in smooth muscle cells", *Endocrinology* 147, 3: 1458-1465, (2006).
- LaCasse, E. C., Baird, S., Korneluk, R. G., and Mackenzie, A. E. "The inhibitors of apoptosis (IAPs) and their emerging role in cancer.", *Oncogene* 17, 25: 3247-3259, (1998).
- Laferriere, N. B. and Brown, D. L. "Effects of taxol on the polymerization and posttranslational modification of class III beta-tubulin in P19 embryonal carcinoma cells", *Biochem. Cell Biol.* 73, 9-10: 687-694, (1995).
- Lai, G. M., Ozols, R. F., Young, R. C., and Hamilton, T. C. "Effect of glutathione on DNA repair in cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines", *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 7: 535-539, (1989).

- Lambe, M., Wu, J., Weiderpass, E., and Hsieh, C. C. "Childbearing at older age and endometrial cancer risk (Sweden)", *Cancer Causes Control* 10, 1: 43-49, (1999).
- Lee, C. M., Fuhrman, C. B., Planelles, V., Peltier, M. R., Gaffney, D. K., Soisson, A. P., Dodson, M. K., Tolley, H. D., Green, C. L., and Zempolich, K. A. "Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines", *Clin. Cancer Res.* 12, 1: 250-256, (2006a).
- Lee, E. R., Kim, J. Y., Kang, Y. J., Ahn, J. Y., Kim, J. H., Kim, B. W., Choi, H. Y., Jeong, M. Y., and Cho, S. G. "Interplay between PI3K/Akt and MAPK signaling pathways in DNA-damaging drug-induced apoptosis", *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 9: 958-968, (2006b).
- Lee, J. O., Yang, H., Georgescu, M. M., Di Cristofano, A., Maehama, T., Shi, Y., Dixon, J. E., Pandolfi, P., and Pavletich, N. P. "Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association", *Cell* 99, 3: 323-334, (1999).
- Lee, L. F., Haskill, J. S., Mukaida, N., Matsushima, K., and Ting, J. P. "Identification of tumor-specific paclitaxel (Taxol)-responsive regulatory elements in the interleukin-8 promoter", *Mol. Cell Biol.* 17, 9: 5097-5105, (1997).
- Leevers, S. J., Weinkove, D., MacDougall, L. K., Hafen, E., and Waterfield, M. D. "The *Drosophila* phosphoinositide 3-kinase Dp110 promotes cell growth", *EMBO J.* 15, 23: 6584-6594, (1996).
- Lefranc, F., Brotchi, J., and Kiss, R. "Possible future issues in the treatment of glioblastomas: special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis", *J. Clin. Oncol.* 23, 10: 2411-2422, (2005).
- Lemke, L. E., Paine-Murrieta, G. D., Taylor, C. W., and Powis, G. "Wortmannin inhibits the growth of mammary tumors despite the existence of a novel wortmannin-insensitive phosphatidylinositol 3-kinase", *Cancer Chemother. Pharmacol.* 44, 6: 491-497, (1999).
- Lentz, S. S., Brady, M. F., Major, F. J., Reid, G. C., and Soper, J. T. "High-dose megestrol acetate in advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study", *J. Clin. Oncol.* 14, 2: 357-361, (1996).
- Levine, R. L., Cargile, C. B., Blazes, M. S., van Rees, B., Kurman, R. J., and Ellenson, L. H. "PTEN mutations and microsatellite instability in complex atypical hyperplasia, a precursor lesion to uterine endometrioid carcinoma", *Cancer Res.* 58, 15: 3254-3258, (1998).
- Li, D. M. and Sun, H. "TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta", *Cancer Res* 57, 11: 2124-2129, (1997).

- Li, F. "Survivin study: what is the next wave?", *J. Cell Physiol.* 197, 1: 8-29, (2003).
- Li, F., Ackermann, E. J., Bennett, C. F., Rothermel, A. L., Plescia, J., Tognin, S., Villa, A., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. "Pleiotropic cell-division defects and apoptosis induced by interference with survivin function", *Nat. Cell Biol.* 1, 8: 461-466, (1999).
- Li, F. and Altieri, D. C. "The cancer antiapoptosis mouse survivin gene: characterization of locus and transcriptional requirements of basal and cell cycle-dependent expression", *Cancer Res.* 59, 13: 3143-3151, (1999).
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E. Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. "Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin", *Nature* 396, 6711: 580-584, (1998).
- Li, H., Niederkorn, J. Y., Neelam, S., and Alizadeh, H. "Downregulation of survivin expression enhances sensitivity of cultured unveal melanoma cells to cisplatin treatment", *Exp. Eye Res.* 83, 1: 176-182, (2006a).
- Li, J., Feng, Q., Kim, J. M., Schneiderman, D., Liston, P., Li, M., Vanderhyden, B., Faught, W., Fung, M. F., Senterman, M., Korneluk, R. G., and Tsang, B. K. "Human ovarian cancer and cisplatin resistance: possible role of inhibitor of apoptosis proteins", *Endocrinology* 142, 1: 370-380, (2001a).
- Li, J., Gorospe, M., Hutter, D., Barnes, J., Keyse, S. M., and Liu, Y. "Transcriptional induction of MKP-1 in response to stress is associated with histone H3 phosphorylation-acetylation", *Mol. Cell Biol.* 21, 23: 813-8224, (2001b).
- Li, J., Sasaki, H., Sheng, Y. L., Schneiderman, D., Xiao, C. W., Kotsuji, F., and Tsang, B. K. "Apoptosis and chemoresistance in human ovarian cancer: is Xiap a determinant?", *Biol. Signals Recept.* 9, 2: 122-130, (2000).
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., Puc, J., Miliaresis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S. H., Giovanella, B. C., Ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M. H., and Parsons, R. "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer", *Science* 275, 5308: 1943-1946, (1997a).
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade", *Cell* 91, 4: 479-489, (1997b).
- Li, Q. X., Zhao, J., Liu, J. Y., Jia, L. T., Huang, H. Y., Xu, Y. M., Zhang, Y., Zhang, R., Wang, C. J., Yao, L. B., Chen, S. Y., and Yang, A. G. "Survivin stable knockdown by siRNA inhibits tumor cell growth and angiogenesis in breast and cervical cancers", *Cancer Biol. Thr.* 5, 7: 860-866, (2006b).

- Li, X., Lu, Y., Jin, W., Liang, K., Mills, G. B., and Fan, Z. "Autophosphorylation of Akt at threonine 72 and serine 246. A potential mechanism of regulation of Akt kinase activity", *J. Biol. Chem.* 281, 19: 13837-13843, (2006c).
- Li, X., Lu, Y., Liang, K., Liu, B., and Fan, Z. "Differential responses to doxorubicin-induced phosphorylation and activation of Akt in human breast cancer cells", *Breast Cancer Res.* 7, 5: 589-597, (2005).
- Li, X., Oghi, K. A., Zhang, J., Krones, A., Bush, K. T., Glass, C. K., Nigam, S. K., Aggarwal, A. K., Maas, R., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. "Eya protein phosphatase activity regulates Six1-Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis", *Nature* 426, 6964: 247-254, (2003).
- Liang, J. and Slingerland, J. M. "Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression", *Cell Cycle* 2, 4: 339-345, (2003).
- Liang, K., Lu, Y., Li, X., Zeng, X., Glazer, R. I., Mills, G. B., and Fan, Z. "Differential roles of phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and akt1 expression and phosphorylation in breast cancer cell resistance to Paclitaxel, Doxorubicin, and gemcitabine", *Mol. Pharmacol.* 70, 3: 1045-1052, (2006).
- Lin, H. M., Tseng, H. C., Wang, C. J., Chyau, C. C., Liao, K. K., Peng, P. L., and Chou, F. P. "Induction of autophagy and apoptosis by the extract of *Solanum nigrum* linn in HepG2 Cells", *J. Agric. Food Chem.*, (2007).
- Lin, J. H., Deng, G., Huang, Q., and Morser, J. "KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 3: 820-831, (2000).
- Lin, M. T., Chang, C. C., Chen, S. T., Chang, H. L., Su, J. L., Chau, Y. P., and Kuo, M. L. "Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation", *J. Biol. Chem.* 279, 23: 24015-24023, (2004).
- Lincoln, S., Blessing, J. A., Lee, R. B., and Rocereto, T. F. "Activity of paclitaxel as second-line chemotherapy in endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study", *Gynecol. Oncol.* 88, 3: 277-281, (2003).
- Ling, X., Bernacki, R. J., Brattain, M. G., and Li, F. "Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest", *J. Biol. Chem.* 279, 15: 15196-15203, (2004).
- Ling, Y. H., Priebe, W., and Perez-Soler, R. "Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells", *Cancer Res.* 53, 8: 1845-1852, (1993).

- Lissoni, A., Zanetta, G., Losa, G., Gabriele, A., Parma, G., and Mangioni, C. "Phase II study of paclitaxel as salvage treatment in advanced endometrial cancer", *Ann. Oncol.* 7, 8: 861-863, (1996).
- Liston, P., Fong, W. G., Kelly, N. L., Toji, S., Miyazaki, T., Conte, D., Tamai, K., Craig, C. G., McBurney, M. W., and Korneluk, R. G. "Identification of XAF1 as an antagonist of XIAP anti-Caspase activity.", *Nat. Cell Biol.* 3, 2: 128-133, (2001).
- Liston, P., Roy, N., Tamai, K., Lefebvre, C., Baird, S., Cherton-Horvat, G., Farahani, R., McLean, M., Ikeda, J. E., MacKenzie, A., and Korneluk, R. G. "Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes.", *Nature* 379, 6563: 349-353, (1996).
- Littlefield, B. A., Gurside, E., Markiewicz, L., McKinley, B., and Hochberg, R. B. "A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: estrogenic action of delta 5 adrenal steroids", *Endocrinology* 127, 6: 2757-2762, (1990).
- Liu, G. H., Wang, S. R., Wang, B., and Kong, B. H. "Inhibition of nuclear factor-kappaB by an antioxidant enhances paclitaxel sensitivity in ovarian carcinoma cell line", *Int. J. Gynecol. Cancer* 16, 5: 1777-1782, (2006).
- Liu, J. P. "Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity", *FASEB J.* 13, 15: 2091-2104, (1999).
- Lodish, H. F. and Darnell, J. E. "Biologie moléculaire de la cellule", 3^e édition de la version anglaise, De Boek Université, Belgique: 1344 pages (1997).
- Lopes, R. B., Gangeswaran, R., McNeish, I. A., Wang, Y., and Lemoine, N. R. "Expression of the IAP protein family is dysregulated in pancreatic cancer cells and is important for resistance to chemotherapy", *Int. J. Cancer* 120, 11: 2344-2352, (2007).
- Lu, Y., Lin, Y. Z., LaPushin, R., Cuevas, B., Fang, X., Yu, S. X., Davies, M. A., Khan, H., Furui, T., Mao, M., Zinner, R., Hung, M. C., Steck, P., Siminovitch, K., and Mills, G. B. "The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells", *Oncogene* 18, 50: 7034-7045, (1999).
- Lynch, H. T., Casey, M. J., Shaw, T. G., and Lynch, J. F. "Hereditary factors in gynecologic cancer", *Oncologist.* 3, 5: 319-338, (1998).
- Mabuchi, S., Ohmichi, M., Kimura, A., Hisamoto, K., Hayakawa, J., Nishio, Y., Adachi, K., Takahashi, K., Arimoto-Ishida, E., Nakatsuji, Y., Tasaka, K., and Murata, Y. "Inhibition of phosphorylation of BAD and Raf-1 by Akt sensitizes human ovarian cancer cells to paclitaxel", *J. Biol. Chem.* 277, 36: 33490-33500, (2002).

- Mabuchi, S., Ohmichi, M., Nishio, Y., Hayasaka, T., Kimura, A., Ohta, T., Kawagoe, J., Takahashi, K., Yada-Hashimoto, N., Seino-Noda, H., Sakata, M., Motoyama, T., Kurachi, H., Testa, J. R., Tasaka, K., and Murata, Y. "Inhibition of inhibitor of nuclear factor-kappaB phosphorylation increases the efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models", *Clin. Cancer Res.* 10, 22: 7645-7654, (2004).
- MacDonald, P. C. and Siiteri, P. K. "The relationship between the extraglandular production of estrone and the occurrence of endometrial neoplasia", *Gynecol. Oncol.* 2, 2-3: 259-263, (1974).
- MacDougall, L. K., Domin, J., and Waterfield, M. D. "A family of phosphoinositide 3-kinases in *Drosophila* identifies a new mediator of signal transduction", *Curr. Biol.* 5, 12: 1404-1415, (1995).
- MacKeigan, J. P., Taxman, D. J., Hunter, D., Earp, H. S., III, Graves, L. M., and Ting, J. P. "Inactivation of the antiapoptotic phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway by the combined treatment of taxol and mitogen-activated protein kinase kinase inhibition", *Clin. Cancer Res.* 8, 7: 2091-2099, (2002).
- Maehama, T. and Dixon, J. E. "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate", *J. Biol. Chem.* 273, 22: 13375-13378, (1998).
- Manthey, C. L., Brandes, M. E., Perera, P. Y., and Vogel, S. N. "Taxol increases steady-state levels of lipopolysaccharide-inducible genes and protein-tyrosine phosphorylation in murine macrophages", *J. Immunol.* 149, 7: 2459-2465, (1992).
- Manthey, C. L., Qureshi, N., Stutz, P. L., and Vogel, S. N. "Lipopolysaccharide antagonists block taxol-induced signaling in murine macrophages", *J. Exp. Med.* 178, 2: 695-702, (1993).
- Matias-Guiu, X., Catusus, L., Bussaglia, E., Lagarda, H., Garcia, A., Pons, C., Munoz, J., Arguelles, R., Machin, P., and Prat, J. "Molecular pathology of endometrial hyperplasia and carcinoma", *Hum. Pathol.* 32, 6: 569-577, (2001).
- Matsumiya, T., Imaizumi, T., Yoshida, H., Kimura, H., and Satoh, K. "Cisplatin inhibits the expression of X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein in an oral carcinoma cell line", *Oral Oncol.* 37, 3: 296-300, (2001).
- Mauro, L. J. and Dixon, J. E. "'Zip codes' direct intracellular protein tyrosine phosphatases to the correct cellular 'address'", *Trends Biochem. Sci.* 19, 4: 151-155, (1994).
- Maxwell, G. L., Risinger, J. I., Gumbs, C., Shaw, H., Bentley, R. C., Barrett, J. C., Berchuck, A., and Futreal, P. A. "Mutation of the PTEN tumor suppressor gene in endometrial hyperplasias", *Cancer Res.* 58, 12: 2500-2503, (1998).

- Mayo, L. D. and Donner, D. B. "The PTEN, Mdm2, p53 tumor suppressor-oncoprotein network", *Trends Biochem. Sci.* 27, 9: 462-467, (2002).
- McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Abrams, S. L., Lee, J. T., Chang, F., Bertrand, F. E., Navolanic, P. M., Terrian, D. M., Franklin, R. A., D'Assoro, A. B., Salisbury, J. L., Mazzarino, M. C., Stivala, F., and Libra, M. "Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance", *Adv. Enzyme Regul.* 46, 249-279, (2006).
- Medina, E. A., Afsari, R. R., Ravid, T., Castillo, S. S., Erickson, K. L., and Goldkorn, T. "Tumor necrosis factor- α decreases Akt protein levels in 3T3-L1 adipocytes via the caspase-dependent ubiquitination of Akt", *Endocrinology* 146, 6: 2726-2735, (2005).
- Mello, J. A., Lippard, S. J., and Essigmann, J. M. "DNA adducts of cis-diamminedichloroplatinum(II) and its trans isomer inhibit RNA polymerase II differentially in vivo", *Biochemistry* 34, 45: 14783-14791, (1995).
- Mickley, L. A., Bates, S. E., Richert, N. D., Currier, S., Tanaka, S., Foss, F., Rosen, N., and Fojo, A. T. "Modulation of the expression of a multidrug resistance gene (mdr-1/P-glycoprotein) by differentiating agents", *J. Biol. Chem.* 264, 30: 18031-18040, (1989).
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., and Gianni, L. "Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity", *Pharmacol. Rev.* 56, 2: 185-229, (2004).
- Misra, S., Ghatak, S., and Toole, B. P. "Regulation of MDR1 expression and drug resistance by a positive feedback loop involving hyaluronan, phosphoinositide 3-kinase, and ErbB2", *J. Biol. Chem.* 280, 21: 20310-20315, (2005).
- Mistry, P., Kelland, L. R., Abel, G., Sidhar, S., and Harrap, K. R. "The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines", *Br. J. Cancer* 64, 2: 215-220, (1991).
- Mistry, P., Loh, S. Y., Kelland, L. R., and Harrap, K. R. "Effect of buthionine sulfoximine on PtII and PtIV drug accumulation and the formation of glutathione conjugates in human ovarian-carcinoma cell lines", *Int. J. Cancer* 55, 5: 848-856, (1993).
- Miyake, H., Hara, I., Yamanaka, K., Arakawa, S., and Kamidono, S. "Synergistic enhancement of resistance to cisplatin in human bladder cancer cells by overexpression of mutant-type p53 and Bcl-2", *J. Urol.* 162, 6: 2176-2181, (1999).
- Mochizuki, T., Sakai, K., and Iwashita, M. "Effects of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 (IGFBP-3) on endometrial cancer (HHUA) cell apoptosis and

- EGF stimulated cell proliferation in vitro", *Growth Horm. IGF. Res.* 16, 3: 202-210, (2006).
- Mohi, M. G. and Neel, B. G. "The role of Shp2 (PTPN11) in cancer", *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17, 1: 23-30, (2007).
- Monzo, M., Rosell, R., Felip, E., Astudillo, J., Sanchez, J. J., Maestre, J., Martin, C., Font, A., Barnadas, A., and Abad, A. "A novel anti-apoptosis gene: Re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers", *J. Clin. Oncol.* 17, 7: 2100-2104, (1999).
- Morgan, S. J., Smith, A. D., and Parker, P. J. "Purification and characterization of bovine brain type I phosphatidylinositol kinase", *Eur. J. Biochem.* 191, 3: 761-767, (1990).
- Mori, N., Kyo, S., Sakaguchi, J., Mizumoto, Y., Ohno, S., Maida, Y., Hashimoto, M., Takakura, M., and Inoue, M. "Concomitant activation of AKT with extracellular-regulated kinase 1/2 occurs independently of PTEN or PIK3CA mutations in endometrial cancer and may be associated with favorable prognosis", *Cancer Sci.* 98, 12: 1881-1888, (2007).
- Morla, A. O., Draetta, G., Beach, D., and Wang, J. Y. "Reversible tyrosine phosphorylation of cdc2: dephosphorylation accompanies activation during entry into mitosis", *Cell* 58, 1: 193-203, (1989).
- Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A. K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P. W., Biegel, J. A., Hayes, R. L., and Wong, A. J. "Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors", *Cancer Res.* 55, 23: 5536-5539, (1995).
- Munger, C., Ellis, A., Woods, K., Randolph, J., Yanovich, S., and Gewirtz, D. "Evidence for inhibition of growth related to compromised DNA synthesis in the interaction of daunorubicin with H-35 rat hepatoma", *Cancer Res.* 48, 9: 2404-2411, (1988).
- Mustelin, T., Abraham, R. T., Rudd, C. E., Alonso, A., and Merlo, J. J. "Protein tyrosine phosphorylation in T cell signaling", *Front. Biosci.* 7, 918-969, (2002a).
- Mustelin, T., Feng, G. S., Bottini, N., Alonso, A., Kholod, N., Birle, D., Merlo, J., and Huynh, H. "Protein tyrosine phosphatases", *Front. Biosci.* 7, 85-142, (2002b).
- Myers, M. P., Pass, I., Batty, I. H., Van, der Kaay, Stolarov, J. P., Hemmings, B. A., Wigler, M. H., Downes, C. P., and Tonks, N. K. "The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 23: 13513-13518, (1998).

- Nakagawa, T., Zhu, H., Morishima, N., Li, E., Xu, J., Yankner, B. A., and Yuan, J. "Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta", *Nature* 403, 6765: 98-103, (2000).
- Nakagawara, A. "Molecular basis of spontaneous regression of neuroblastoma: role of neurotrophic signals and genetic abnormalities", *Hum. Cell* 11, 3: 115-124, (1998).
- Nakatani, K., Sakaue, H., Thompson, D. A., Weigel, R. J., and Roth, R. A. "Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 257, 3: 906-910, (1999a).
- Nakatani, K., Thompson, D. A., Barthel, A., Sakaue, H., Liu, W., Weigel, R. J., and Roth, R. A. "Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgen-independent prostate cancer lines", *J. Biol. Chem.* 274, 31: 21528-21532, (1999b).
- Newcomb, P. A. and Trentham-Dietz, A. "Breast feeding practices in relation to endometrial cancer risk, USA", *Cancer Causes Control* 11, 7: 663-667, (2000).
- Ng, S. S. W., Tsao, M. S., Chow, S., and Hedley, D. W. "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells", *Cancer Res.* 60, 19: 5451-5455, (2000).
- Nguyen, D. M., Chen, G. A., Reddy, R., Tsai, W., Schrump, W. D., Cole, G., Jr., and Schrump, D. S. "Potentiation of paclitaxel cytotoxicity in lung and esophageal cancer cells by pharmacologic inhibition of the phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt)-mediated signaling pathway", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 127, 2: 365-375, (2004).
- Nicotera, P. and Melino, G. "Regulation of the apoptosis-necrosis switch", *Oncogene* 23, 16: 2757-2765, (2004).
- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., and Uemura, T. "Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin", *Cell* 108, 2: 233-246, (2002).
- Noguchi, T., Metz, R., Chen, L., Mattei, M. G., Carrasco, D., and Bravo, R. "Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth", *Mol. Cell Biol.* 13, 9: 5195-5205, (1993).
- Nomura, T., Mimata, H., Takeuchi, Y., Yamamoto, H., Miyamoto, E., and Nomura, Y. "The X-linked inhibitor of apoptosis protein inhibits taxol-induced apoptosis in LNCaP cells", *Urol. Res.* 31, 1: 37-44, (2003).

- Nomura, T., Yamasaki, M., Nomura, Y., and Mimata, H. "Expression of the inhibitors of apoptosis proteins in cisplatin-resistant prostate cancer cells", *Oncol. Rep.* 14, 4: 993-997, (2005).
- Nuydens, R., Dispersyn, G., Van Den, Kieboom G., de Jong, M., Connors, R., Ramaekers, F., Borgers, M., and Geerts, H. "Bcl-2 protects neuronal cells against taxol-induced apoptosis by inducing multi-nucleation", *Apoptosis* 5, 4: 335-343, (2000).
- O'Connor, D. S., Grossman, D., Plescia, J., Li, F., Zhang, H., Villa, A., Tognin, S., Marchisio, P. C., and Altieri, D. C. "Regulation of apoptosis at cell division by p34cdc2 phosphorylation of survivin", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 24: 13103-13107, (2000).
- Oberstein, A., Jeffrey, P., and Shi, Y. "Crystal structure of the BCL-XL-beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein", *J. Biol. Chem.* 27, 282: 13123-13132, (2007).
- Ohta, S., Nishio, K., Kubota, N., Ohmori, T., Funayama, Y., Ohira, T., Nakajima, H., Adachi, M., and Saijo, N. "Characterization of a taxol-resistant human small-cell lung cancer cell line", *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 3: 290-297, (1994).
- Okada, H. and Mak, T. W. "Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells", *Nat. Rev. Cancer* 4, 8: 592-603, (2004).
- Okano, J., Gaslightwala, I., Birnbaum, M. J., Rustgi, A. K., and Nakagawa, H. "Akt/protein kinase B isoforms are differentially regulated by epidermal growth factor stimulation", *J. Biol. Chem.* 275, 40: 30934-30942, (2000).
- Okumura, K., Mendoza, M., Bachoo, R. M., Depinho, R. A., Cavenee, W. K., and Furnari, F. B. "PCAF modulates PTEN activity", *J. Biol. Chem.* 281, 36: 26562-26568, (2006).
- Olie, R. A., Simoes-Wust, A. P., Baumann, B., Leech, S. H., Fabbro, D., Stahel, R. A., and Zangemeister-Wittke, U. "A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy", *Cancer Res.* 60, 11: 2805-2809, (2000).
- Osaki, M., Oshimura, M., and Ito, H. "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer", *Apoptosis* 9, 6: 667-676, (2004).
- Ostman, A., Hellberg, C., and Bohmer, F. D. "Protein-tyrosine phosphatases and cancer", *Nature* 6, 4: 307-320, (2006).
- Otsu, M., Hiles, I., Gout, I., Fry, M. J., Ruiz-Larrea, F., Panayotou, G., Thompson, A., Dhand, R., Hsuan, J., and Totty, N. "Characterization of two 85 kd proteins that associate with receptor tyrosine kinases, middle-T/pp60c-src complexes, and PI3-kinase", *Cell* 65, 1: 91-104, (1991).

- Ozes, O. N., Mayo, L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M., and Donner, D. B. "NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase", *Nature* 401, 6748: 82-85, (1999).
- Page, C., Lin, H. J., Jin, Y., Castle, V. P., Nunez, G., Huang, M., and Lin, J. "Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis", *Anticancer Res.* 20, 1A: 407-416, (2000).
- Panaretou, C., Domin, J., Cockcroft, S., and Waterfield, M. D. "Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex", *J. Biol. Chem.* 272, 4: 2477-2485, (1997).
- Papapetropoulos, A., Fulton, D., Mahboubi, K., Kalb, R. G., O'Connor, D. S., Li, F., Altieri, D. C., and Sessa, W. C. "Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/survivin pathway", *J. Biol. Chem.* 275, 13: 9102-9105, (2000).
- Park, S. J., Wu, C. H., Gordon, J. D., Zhong, X., Emami, A., and Safa, A. R. "Taxol induces caspase-10-dependent apoptosis", *J. Biol. Chem.* 279, 49: 51057-51067, (2004).
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. "Global cancer statistics, 2002", *CA Cancer J. Clin.* 55, 2: 74-108, (2005).
- Parness, J. and Horwitz, S. B. "Taxol binds to polymerized tubulin in vitro", *J. Cell Biol.* 91, 2 Pt 1: 479-487, (1981).
- Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D., and Levine, B. "Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy", *Cell* 122, 6: 927-939, (2005).
- Pavelic, J., Matijevic, T., and Knezevic, J. "Biological & physiological aspects of action of insulin-like growth factor peptide family", *Indian J. Med. Res.* 125, 4: 511-522, (2007).
- Pectasides, D., Pectasides, E., and Economopoulos, T. "Systemic therapy in metastatic or recurrent endometrial cancer", *Cancer Treat Rev.* 1-14, (2006).
- Perego, P., Giarola, M., Righetti, S. C., Supino, R., Caserini, C., Delia, D., Pierotti, M. A., Miyashita, T., Reed, J. C., and Zunino, F. "Association between cisplatin resistance and mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell systems", *Cancer Res.* 56, 3: 556-562, (1996).
- Petrakis, N. L., Wensch, M. R., Ernster, V. L., Miike, R., Murai, J., Simberg, N., and Siiteri, P. K. "Influence of pregnancy and lactation on serum and breast fluid estrogen levels: implications for breast cancer risk", *Int. J. Cancer* 40, 5: 587-591, (1987).

- Plas, D. R. and Thompson, C. B. "Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving", *Oncogene Rev.* 24, 50: 7435-7442, (2005).
- Podsypanina, K., Ellenson, L. H., Nemes, A., Gu, J., Tamura, M., Yamada, K. M., Cordon-Cardo, C., Catorretti, G., Fisher, P. E., and Parsons, R. "Mutation of Pten/Mmac1 in mice causes neoplasia in multiple organ systems", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 4: 1563-1568, (1999).
- Podsypanina, K., Lee, R. T., Politis, C., Hennessy, I., Crane, A., Puc, J., Neshat, M., Wang, H., Yang, L., Gibbons, J., Frost, P., Dreisbach, V., Blenis, J., Gaciong, Z., Fisher, P., Sawyers, C., Hedrick-Ellenson, L., and Parsons, R. "An inhibitor of mTOR reduces neoplasia and normalizes p70/S6 kinase activity in Pten+/- mice.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 18: 10320-10325, (2001).
- Pommier, Y., Sordet, O., Antony, S., Hayward, R. L., and Kohn, K. W. "Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks", *Oncogene* 23, 16: 2934-2949, (2004).
- Pot, D. A., Woodford, T. A., Remboutsika, E., Haun, R. S., and Dixon, J. E. "Cloning, bacterial expression, purification, and characterization of the cytoplasmic domain of rat LAR, a receptor-like protein tyrosine phosphatase", *J. Biol. Chem.* 266, 29: 19688-19696, (1991).
- Powis, G., Bonjouklian, R., Berggren, M. M., Gallegos, A., Abraham, R., Ashendel, C., Zalkow, L., Matter, W. F., Dodge, J., and Grindey, G. "Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase", *Cancer Res* 54, 9: 2419-2423, (1994).
- Pratt, M. A., Niu, M. Y., and Renart, L. I. "Regulation of survivin by retinoic acid and its role in paclitaxel-mediated cytotoxicity in MCF-7 breast cancer cells", *Apoptosis* 11, 4: 589-605, (2006).
- Prenzel, N., Fischer, O. M., Streit, S., Hart, S., and Ullrich, A. "The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification", *Endocr. Relat. Cancer* 8, 1: 11-31, (2001).
- Qiu, X. B. and Goldberg, A. L. "The membrane-associated inhibitor of apoptosis protein, BRUCE/Apollon, antagonizes both the precursor and mature forms of Smac and caspase-9", *J. Biol. Chem.* 280, 1: 174-182, (2005).
- Rane, M. J., Coxon, P. Y., Powell, D. W., Webster, R., Klein, J. B., Pierce, W., Ping, P., and McLeish, K. R. "p38 Kinase-dependent MAPKAPK-2 activation functions as 3-phosphoinositide-dependent kinase-2 for Akt in human neutrophils", *J. Biol. Chem.* 276, 5: 3517-3523, (2001).
- Rao, S., Orr, G. A., Chaudhary, A. G., Kingston, D. G., and Horwitz, S. B. "Characterization of the taxol binding site on the microtubule. 2-(m-

- azidobenzoyl)taxol photolabels a peptide (amino acids 217-231) of beta-tubulin", *J. Biol. Chem.* 270, 35: 20235-20238, (1995).
- Raugei, G., Ramponi, G., and Chiarugi, P. "Low molecular weight protein tyrosine phosphatases: small, but smart", *Cell Mol. Life Sci.* 59, 6: 941-949, (2002).
- Rayapureddi, J. P., Kattamuri, C., Steinmetz, B. D., Frankfort, B. J., Ostrin, E. J., Mardon, G., and Hegde, R. S. "Eyes absent represents a class of protein tyrosine phosphatases", *Nature* 426, 6964: 295-298, (2003).
- Reed, J. C. "Bcl-2 and the regulation of programmed cell death", *J. Cell Biol.* 124, 1-2: 1-6, (1994).
- Reed, J. C. "Mechanisms of Bcl-2 family protein function and dysfunction in health and disease", *Behring Inst. Mitt.* 97: 72-100, (1996).
- Rice, L. W., Stone, R. L., Xu, M., Galgano, M., Stoler, M. H., Everett, E. N., and Jazaeri, A. A. "Biologic targets for therapeutic intervention in endometrioid endometrial adenocarcinoma and malignant mixed mullerian tumors", *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194, 4: 1119-1128, (2006).
- Richter, B. W., Mir, S. S., Eiben, L. J., Lewis, J., Reffey, S. B., Frattini, A., Tian, L., Frank, S., Youle, R. J., Nelson, D. L., Notarangelo, L. D., Vezzoni, P., Fearnhead, H. O., and Duckett, C. S. "Molecular cloning of ILP-2, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family", *Mol. Cell Biol.* 21, 13: 4292-4301, (2001).
- Rizkallah, T. H., Tovell, H. M., and Kelly, W. G. "Production of estrone and fractional conversion of circulating androstenedione to estrone in women with endometrial carcinoma", *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 40, 6: 1045-1051, (1975).
- Robertson, G. P. "Functional and therapeutic significance of Akt deregulation in malignant melanoma", *Can. Met. Rev.* 24, 2: 273-285, (2005).
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D., and Downward, J. "Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras", *Nature* 370, 6490: 527-532, (1994).
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Khwaja, A., Marte, B. M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M. D., Ridley, A., and Downward, J. "Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras", *Cell* 89, 3: 475-467, (1997).
- Rodriguez-Viciana, P., Warne, P. H., Vanhaesebroeck, B., Waterfield, M. D., and Downward, J. "Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation", *EMBO J.* 15, 10: 2442-2451, (1996).

- Rondinone, C. M., Clampit, J., Gum, R. J., Zinker, B. A., Jirousek, M. R., and Trevillyan, J. M. "Reduction of PTP1B induces differential expression of PI3-kinase (p85alpha) isoforms", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323, 2: 652-659, (2004).
- Rosenblatt, K. A. and Thomas, D. B. "Prolonged lactation and endometrial cancer. WHO collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives", *Int. J. Epidemiol.* 24, 3: 499-503, (1995).
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases", *EMBO J.* 16, 23: 6914-6925, (1997).
- Roy, N., Mahadevan, M. S., McLean, M., Shutler, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner-Johnston, A., Lefebvre, C., and Kang, X. "The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy", *Cell* 80, 1: 167-178, (1995).
- Ruggero, D. and Pandolfi, P. P. "Does the ribosome translate cancer?", *Nat. Rev. Cancer* 3, 3: 179-192, (2003).
- Ruggero, D. and Sonenberg, N. "The Akt of translational control", *Oncogene Rev.* 24, 50: 7426-7434, (2005).
- Ryan, A. J., Susil, B., Jobling, T. W., and Oehler, M. K. "Endometrial cancer", *Cell Tissue Res.* 322, 1: 53-61, (2006).
- Ryoo, H. D., Bergmann, A., Gonen, H., Ciechanover, A., and Steller, H. "Regulation of Drosophila IAP1 degradation and apoptosis by reaper and ubcD1", *Nat. Cell Biol.* 4, 6: 432-438, (2002).
- Sah, N. K., Khan, Z., Khan, G. J., and Bisen, P. S. "Structural, functional and therapeutic biology of survivin", *Cancer Lett.* 244, 2: 164-171, (2006).
- Sakakura, C., Sweeney, E. A., Shirahama, T., Igarashi, Y., Hakomori, S., Tsujimoto, H., Imanishi, T., Ogaki, M., Ohyama, T., Yamazaki, J., Hagiwara, A., Yamaguchi, T., Sawai, K., and Takahashi, T. "Overexpression of bax sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and etoposide", *Surg. Today* 27, 7: 676-679, (1997).
- Salazar-Martinez, E., Lazcano-Ponce, E. C., Gonzalez Lira-Lira, G., Escudero-De los Rios P., Salmeron-Castro, J., and Hernandez-Avila, M. "Reproductive factors of ovarian and endometrial cancer risk in a high fertility population in Mexico", *Cancer Res.* 59, 15: 3658-3662, (1999).
- Saleh, A., Srinivasula, S. M., Acharya, S., Fishel, R., and Alnemri, E. S. "Cytochrome c and dATP-mediated oligomerization of Apaf-1 is a prerequisite for procaspase-9 activation", *J. Biol. Chem.* 274, 25: 17941-17945, (1999).

- Salles, B., Butour, J. L., Lesca, C., and Macquet, J. P. "cis-Pt(NH₃)₂Cl₂ and trans-Pt(NH₃)₂Cl₂ inhibit DNA synthesis in cultured L1210 leukemia cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 2: 555-563, (1983).
- Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. "Caspases: intracellular signaling by proteolysis", *Cell* 91, 4: 433-446, (1997).
- Salvesen, G. S. and Duckett, C. S. "IAP proteins: blocking the road to death's door", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 6: 401-410, (2002).
- Sanchez-Margalet, V., Goldfine, I. D., Vlahos, C. J., and Sung, C. K. "Role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin receptor signaling: studies with inhibitor, LY294002", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 204, 2: 446-452, (1994).
- Sandles, L. G., Shulman, L. P., Elias, S., Photopulos, G. J., Smiley, L. M., Posten, W. M., and Simpson, J. L. "Endometrial adenocarcinoma: genetic analysis suggesting heritable site-specific uterine cancer", *Gynecol. Oncol.* 47, 2: 167-171, (1992).
- Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M., and Sabatini, D. M. "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex", *Science* 307, 5712: 1098-1101, (2005).
- Satow, R., Chan, T. C., and Asashima, M. "Molecular cloning and characterization of dullard: a novel gene required for neural development", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 295, 1: 85-91, (2002).
- Savill, J., Dransfield, I., Hogg, N., and Haslett, C. "Vitronectin receptor-mediated phagocytosis of cells undergoing apoptosis", *Nature* 343, 6254: 170-173, (1990).
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Haslett, C. "Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis", *Immunol. Today* 14, 3: 131-136, (1993).
- Saxena, M. and Mustelin, T. "Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase", *Semin. Immunol.* 12, 4: 387-396, (2000).
- Scheid, M. P., Marignani, P. A., and Woodgett, J. R. "Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B", *Mol. Cell Biol.* 22, 17: 6247-6260, (2002).
- Schiff, P. B. and Horwitz, S. B. "Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 77, 3: 1561-1565, (1980).
- Schiff, P. B. and Horwitz, S. B. "Taxol assembles tubulin in the absence of exogenous guanosine 5'-triphosphate or microtubule-associated proteins", *Biochemistry* 20, 11: 3247-3252, (1981).

- Schmidt, M., Hovelmann, S., and Beckers, T. L. "A novel form of constitutively active farnesylated Akt1 prevents mammary epithelial cells from anoikis and suppresses chemotherapy-induced apoptosis", *Br. J. Cancer* 87, 8: 924-932, (2002).
- Schu, P. V., Takegawa, K., Fry, M. J., Stack, J. H., Waterfield, M. D., and Emr, S. D. "Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast VPS34 gene essential for protein sorting", *Science* 260, 5104: 88-91, (1993).
- Seski, J. C., Edwards, C. L., Herson, J., and Rutledge, F. N. "Cisplatin chemotherapy for disseminated endometrial cancer", *Obstet. Gynecol.* 59, 2: 225-228, (1982).
- Sharma, H., Sen, S., Lo, Muzio L., Mariggio, A., and Singh, N. "Antisense-mediated downregulation of anti-apoptotic proteins induces apoptosis and sensitizes head and neck squamous cell carcinoma cells to chemotherapy", *Cancer Biol. Thr.* 4, 7: 720-727, (2005).
- Shayesteh, L., Lu, Y., Kuo, W. L., Baldocchi, R., Godfrey, T., Collins, C., Pinkel, D., Powell, B., Mills, G. B., and Gray, J. W. "PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer [see comments]", *Nat. Genet.* 21, 1: 99-102, (1999).
- Shen, D. W., Fojo, A., Chin, J. E., Roninson, I. B., Richert, N., Pastan, I., and Gottesman, M. M. "Human multidrug-resistant cell lines: increased *mdr1* expression can precede gene amplification", *Science* 232, 4750: 643-645, (1986).
- Shi, R. X., Ong, C. N., and Shen, H. M. "Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells", *Cancer Res.* 65, 17: 7815-7823, (2005).
- Shi, Y. "A conserved tetrapeptide motif: potentiating apoptosis through IAP-binding", *Cell Death. Differ.* 9, 2: 93-95, (2002).
- Shin, H., Renatus, M., Eckelman, B. P., Nunes, V. A., Sampaio, C. A., and Salvesen, G. S. "The BIR domain of IAP-like protein 2 is conformationally unstable: implications for caspase inhibition", *Biochem. J.* 385, Pt 1: 1-10, (2005).
- Shin, S., Sung, B. J., Cho, Y. S., Kim, H. J., Ha, N. C., Hwang, J. I., Chung, C. W., Jung, Y. K., and Oh, B. H. "An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and -7", *Biochemistry* 40, 4: 1117-1123, (2001).
- Siniosoglou, S., Santos-Rosa, H., Rappsilber, J., Mann, M., and Hurt, E. "A novel complex of membrane proteins required for formation of a spherical nucleus", *EMBO J.* 17, 22: 6449-6464, (1998).
- Skladanowski, A. and Konopa, J. "Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells", *Biochem. Pharmacol.* 46, 3: 375-382, (1993).

- Skolnik, E. Y., Margolis, B., Mohammadi, M., Lowenstein, E., Fischer, R., Drepps, A., Ullrich, A., and Schlessinger, J. "Cloning of PI3 kinase-associated p85 utilizing a novel method for expression/cloning of target proteins for receptor tyrosine kinases", *Cell* 65, 1: 83-90, (1991).
- Société canadienne du cancer "Cancer de l'utérus: Ce que vous devez savoir", www.cancer.ca, (2007).
- Sorenson, C. M., Barry, M. A., and Eastman, A. "Analysis of events associated with cell cycle arrest at G2 phase and cell death induced by cisplatin", *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 9: 749-755, (1990).
- Sorenson, C. M. and Eastman, A. "Influence of cis-diamminedichloroplatinum(II) on DNA synthesis and cell cycle progression in excision repair proficient and deficient Chinese hamster ovary cells", *Cancer Res.* 48, 23: 6703-6707, (1988a).
- Sorenson, C. M. and Eastman, A. "Mechanism of cis-diamminedichloroplatinum(II)-induced cytotoxicity: role of G2 arrest and DNA double-strand breaks", *Cancer Res.* 48, 16: 4484-4488, (1988b).
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E. S. "A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis", *Nature* 410, 6824: 112-116, (2001).
- St Germain, M. E., Gagnon, V., Parent, S., and Asselin, E. "Regulation of COX-2 protein expression by Akt in endometrial cancer cells is mediated through NF-kappaB/IkappaB pathway", *Mol. Cancer* 3, 1: 7-, (2004).
- Staal, S. P. and Hartley, J. W. "Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus", *J. Exp. Med.* 167, 3: 1259-1264, (1988).
- Staal, S. P., Hartley, J. W., and Rowe, W. P. "Isolation of transforming murine leukemia viruses from mice with a high incidence of spontaneous lymphoma", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 7: 3065-3067, (1977).
- Staal, S. P., Huebner, K., Croce, C. M., Parsa, N. Z., and Testa, J. R. "The AKT1 proto-oncogene maps to human chromosome 14, band q32", *Genomics* 2, 1: 96-98, (1988).
- Stambolic, V., Tsao, M. S., Macpherson, D., Suzuki, A., Chapman, W. B., and Mak, T. W. "High incidence of breast and endometrial neoplasia resembling human Cowden syndrome in pten+/- mice.", *Cancer Res.* 60, 13: 3605-3611, (2000).
- Steck, P. A., Pershouse, M. A., Jasser, S. A., Yung, W. K., Lin, H., Ligon, A. H., Langford, L. A., Baumgard, M. L., Hattier, T., Davis, T., Frye, C., Hu, R., Swedlund, B., Teng, D. H., and Tavtigian, S. V. "Identification of a candidate

- tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers", *Nat. Genet.* 15, 4: 356-362, (1997).
- Stehlik, C., de Martin, R., Kumabashiri, I., Schmid, J. A., Binder, B. R., and Lipp, J. "Nuclear factor (NF)-kappaB-regulated X-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis", *J. Exp. Med.* 188, 1: 211-216, (1998).
- Stennicke, H. R., Ryan, C. A., and Salvesen, G. S. "Reprieve from execution: the molecular basis of caspase inhibition", *Trends Biochem. Sci.* 27, 2: 94-101, (2002).
- Stephens, B. J., Han, H., Gokhale, V., and Von Hoff, D. D. "PRL phosphatases as potential molecular targets in cancer", *Mol. Cancer Ther.* 4, 11: 1653-1661, (2005).
- Stoker, A. W. "Protein tyrosine phosphatases and signalling", *J. Endocrinol.* 185, 1: 19-33, (2005).
- Stone, R. L. and Dixon, J. E. "Protein-tyrosine phosphatases", *J. Biol. Chem.* 269, 50: 31323-31326, (1994).
- Stoyanov, B., Volinia, S., Hanck, T., Rubio, I., Loubtchenkov, M., Malek, D., Stoyanova, S., Vanhaesebroeck, B., Dhand, R., and Nurnberg, B. "Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase", *Science* 269, 5224: 690-693, (1995).
- Streuli, M., Krueger, N. X., Tsai, A. Y., and Saito, H. "A family of receptor-linked protein tyrosine phosphatases in humans and *Drosophila*", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 22: 8698-8702, (1989).
- Sugimoto, C., Fujieda, S., Seki, M., Sunaga, H., Fan, G. K., Tsuzuki, H., Borner, C., Saito, H., and Matsukawa, S. "Apoptosis-promoting gene (bax) transfer potentiates sensitivity of squamous cell carcinoma to cisplatin in vitro and in vivo", *Int. J. Cancer* 82, 6: 860-867, (1999).
- Sun, C., Cai, M., Gunasekera, A. H., Meadows, R. P., Wang, H., Chen, J., Zhang, H., Wu, W., Xu, N., Ng, S. C., and Fesik, S. W. "NMR structure and mutagenesis of the inhibitor-of-apoptosis protein XIAP.", *Nature* 401, 6755: 818-822, (1999).
- Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F., and Tonks, N. K. "MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo", *Cell* 75, 3: 5487-5493, (1993).
- Sun, H., Enomoto, T., Fujita, M., Wada, H., Yoshino, K., Ozaki, K., Nakamura, T., and Murata, Y. "Mutational analysis of the PTEN gene in endometrial carcinoma and hyperplasia", *Am. J. Clin. Pathol.* 115, 1: 32-38, (2001a).

- Sun, M., Paciga, J. E., Feldman, R. I., Yuan, Z., Coppola, D., Lu, Y. Y., Shelley, S. A., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. "Phosphatidylinositol-3-OH kinase (PI3K)/AKT2, activated in breast cancer, regulates and is induced by estrogen receptor alpha (ERalpha) via interaction between ERalpha and PI3K", *Cancer Res.* 61, 16: 5985-5991, (2001b).
- Sun, M., Wang, G., Paciga, J. E., Feldman, R. I., Yuan, Z. Q., Ma, X. L., Shelley, S. A., Jove, R., Tsichlis, P. N., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. "AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells", *Am. J. Pathol.* 159, 2: 431-437, (2001c).
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death", *Mol. Cell* 8, 3: 613-621, (2001).
- Swift, L. P., Rephaeli, A., Nudelman, A., Phillips, D. R., and Cutts, S. M. "Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death", *Cancer Res.* 66, 9: 4863-4871, (2006).
- Takahashi, A. and Earnshaw, W. C. "ICE-related proteases in apoptosis", *Curr. Opin. Genet. Dev.* 6, 1: 50-55, (1996).
- Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G. S., and Reed, J. C. "A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases.", *J. Biol. Chem.* 273, 14: 7787-7790, (1998).
- Tanaka, M., Koul, D., Davies, M. A., Liebert, M., Steck, P. A., and Grossman, H. B. "MMAC1/PTEN inhibits cell growth and induces chemosensitivity to doxorubicin in human bladder cancer cells", *Oncogene* 19, 47: 5406-5412, (2000).
- Taylor, J. K., Zhang, Q. Q., Monia, B. P., Marcusson, E. G., and Dean, N. M. "Inhibition of Bcl-xL expression sensitizes normal human keratinocytes and epithelial cells to apoptotic stimuli", *Oncogene* 18, 31: 4495-4504, (1999).
- Testa, J. R. and Bellacosa, A. "AKT plays a central role in tumorigenesis", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 20: 10983-10985, (2001).
- Thant, A. A., Nawa, A., Kikkawa, F., Ichigotani, Y., Zhang, Y., Sein, T. T., Amin, A. R., and Hamaguchi, M. "Fibronectin activates matrix metalloproteinase-9 secretion via the MEK1-MAPK and the PI3K-Akt pathways in ovarian cancer cells", *Clin. Exp. Metastasis* 18, 5: 423-428, (2000).
- Thigpen, J. T., Blessing, J. A., Homesley, H., Creasman, W. T., and Sutton, G. "Phase II trial of cisplatin as first-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study", *Gynecol. Oncol.* 33, 1: 68-70, (1989).

- Thigpen, J. T., Blessing, J. A., Lagasse, L. D., Disaia, P. J., and Homesley, H. D. "Phase II trial of cisplatin as second-line chemotherapy in patients with advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study", *Am. J. Clin. Oncol.* 7, 3: 253-256, (1984).
- Thigpen, J. T., Brady, M. F., Alvarez, R. D., Adelson, M. D., Homesley, H. D., Manetta, A., Soper, J. T., and Given, F. T. "Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study", *J. Clin. Oncol.* 17, 6: 1736-1744, (1999).
- Thigpen, J. T., Brady, M. F., Homesley, H. D., Malfetano, J., DuBeshter, B., Burger, R. A., and Liao, S. "Phase III trial of doxorubicin with or without cisplatin in advanced endometrial carcinoma: a Gynecologic Oncology Group Study", *J. Clin. Oncol.* 22, 19: 3902-2908, (2004).
- Thompson, C. B. "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease", *Science* 267, 5203: 1456-1462, (1995).
- Thornberry, N. A. and Lazebnik, Y. "Caspases: enemies within", *Science* 28, 5381: 1312-1316, (1998).
- Tirro, E., Consoli, M. L., Massimino, M., Manzella, L., Frasca, F., Sciacca, L., Vicari, L., Stassi, G., Messina, L., Messina, A., and Vigneri, P. "Altered expression of c-IAP1, survivin, and Smac contributes to chemotherapy resistance in thyroid cancer cells", *Cancer Res* 66, 8: 4263-4272, (2006).
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., and Fischer, E. H. "Characterization of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta", *J. Biol. Chem.* 263, 14: 6731-6737, (1988a).
- Tonks, N. K., Diltz, C. D., and Fischer, E. H. "Purification of the major protein-tyrosine-phosphatases of human placenta", *J. Biol. Chem.* 263, 14: 6722-6730, (1988b).
- Tootle, T. L., Silver, S. J., Davies, E. L., Newman, V., Latek, R. R., Mills, I. A., Selengut, J. D., Parlikar, B. E., and Rebay, I. "The transcription factor Eyes absent is a protein tyrosine phosphatase", *Nature* 426, 6964: 299-302, (2003).
- Torres, J. and Pulido, R. "The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation", *J. Biol. Chem.* 276, 2: 993-998, (2001).
- Torres, K. and Horwitz, S. B. "Mechanisms of Taxol-induced cell death are concentration dependent", *Cancer Res.* 58, 16: 3620-3626, (1998).
- Tortora, G. J. and Grabowski, S. R. "Principes d'anatomie et de physiologie". 9^e édition de la version anglaise, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., Saint-Laurent, Canada: 1121 pages (2001).

- Tran, J., Rak, J., Sheehan, C., Saibil, S. D., LaCasse, E., Korneluk, R. G., and Kerbel, R. S. "Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 264, 3: 781-788, (1999).
- Tsugawa, K., Jones, M. K., Sugimachi, K., Sarfeh, I. J., and Tarnawski, A. S. "Biological role of phosphatase PTEN in cancer and tissue injury healing", *Front. Biosci.* 7, 245-251, (2002).
- Tudor, G., Aguilera, A., Halverson, D. O., Laing, N. D., and Sausville, E. A. "Susceptibility to drug-induced apoptosis correlates with differential modulation of Bad, Bcl-2 and Bcl-xL protein levels", *Cell Death. Differ.* 7, 6: 574-586, (2000).
- Uchida, K., Tanaka, Y., Nishimura, T., Hashimoto, Y., Watanabe, T., and Harada, I. "Effect of serum on inhibition of DNA synthesis in leukemia cells by cis- and trans-(Pt(NH₃)₂Cl₂)", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 2: 631-637, (1986).
- Uchida, M., Iwase, M., Takaoka, S., Yoshida, S., Kondo, G., Watanabe, H., Ohashi, M., Nagumo, M., and Shintani, S. "Enhanced susceptibility to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis in oral squamous cell carcinoma cells treated with phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors", *Int. J. Oncol.* 30, 5: 1163-1171, (2007).
- Ueda, H., Morishita, R., Narumiya, S., Kato, K., and Asano, T. "Gα₁₂/11 signaling induces apoptosis through two pathways involving reduction of Akt phosphorylation and activation of RhoA in HeLa cells", *Exp. Cell Res.* 298, 1: 207-217, (2004).
- Ugi, S., Imamura, T., Maegawa, H., Egawa, K., Yoshizaki, T., Shi, K., Obata, T., Ebina, Y., Kashiwagi, A., and Olefsky, J. M. "Protein phosphatase 2A negatively regulates insulin's metabolic signaling pathway by inhibiting Akt (protein kinase B) activity in 3T3-L1 adipocytes", *Mol. Cell Biol.* 24, 19: 8778-8789, (2004).
- Vallee, R. B. "A taxol-dependent procedure for the isolation of microtubules and microtubule-associated proteins (MAPs)", *J. Cell Biol.* 92, 2: 435-442, (1982).
- Van der Bliek, A. M., Baas, F., Ten Houte, de Lange, Kooiman, P. M., Van, der, V., and Borst, P. "The human *mdr3* gene encodes a novel P-glycoprotein homologue and gives rise to alternatively spliced mRNAs in liver", *EMBO J.* 6, 11: 3325-3331, (1987).
- Van der Bliek, A. M., Kooiman, P. M., Schneider, C., and Borst, P. "Sequence of *mdr3* cDNA encoding a human P-glycoprotein", *Gene* 71, 2: 401-411, (1988).

- Van Kanegan, M. J., Adams, D. G., Wadzinski, B. E., and Strack, S. "Distinct protein phosphatase 2A heterotrimers modulate growth factor signaling to extracellular signal-regulated kinases and Akt", *J. Biol. Chem.* 280, 43: 36029-36036, (2005).
- Van Loo, G., Schotte, P., van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R., and Vandenabeele, P. "Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation", *Cell Death. Differ.* 8, 12: 1136-1142, (2001).
- Van Loo, G., van Gorp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. "The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity", *Cell Death. Differ.* 9, 1: 20-26, (2002).
- VanderWeele, D. J., Zhou, R., and Rudin, C. M. "Akt up-regulation increases resistance to microtubule-directed chemotherapeutic agents through mammalian target of rapamycin", *Mol. Cancer Ther.* 3, 12: 1605-1613, (2004).
- Vandromme, M., Rochat, A., Meier, R., Carnac, G., Besser, D., Hemmings, B. A., Fernandez, A., and Lamb, N. J. "Protein kinase B beta/Akt2 plays a specific role in muscle differentiation", *J. Biol. Chem.* 276, 11: 8173-8179, (2001).
- Vanhaesebroeck, B. and Alessi, D. R. "The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB", *Biochem. J.* 346 Pt 3, 561-576, (2000).
- Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D. "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases", *Exp. Cell Res.* 253, 1: 239-254, (1999).
- Vaux, D. L. "CED-4-the third horseman of apoptosis", *Cell* 90, 3: 389-390, (1997).
- Vazquez, F., Ramaswamy, S., Nakamura, N., and Sellers, W. R. "Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function", *Mol Cell Biol* 20, 14: 5010-5018, (2000).
- Venkatraman, M., Anto, R. J., Nair, A., Varghese, M., and Karunakaran, D. "Biological and chemical inhibitors of NF-kappaB sensitize SiHa cells to cisplatin-induced apoptosis", *Mol. Carc.* 44, 1: 51-59, (2005).
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins", *Cell* 102, 1: 43-53, (2000).
- Vessey, M. P. and Painter, R. "Endometrial and ovarian cancer and oral contraceptives-findings in a large cohort study", *Br. J. Cancer* 71, 6: 1340-1342, (1995).

- Villa, P., Kaufmann, S. H., and Earnshaw, W. C. "Caspases and caspase inhibitors.", *Trends. Biochem. Sci.* 22, 10: 388-393, (1997).
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E. S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, A. "The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation", *Mol. Cell* 2, 6: 709-718, (1998).
- Vivanco, I. and Sawyers, C. L. "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer", *Nat. Rev. Cancer* 2, 7: 489-501, (2002).
- Voelkel-Johnson, C., King, D. L., and Norris, J. S. "Resistance of prostate cancer cells to soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL/Apo2L) can be overcome by doxorubicin or adenoviral delivery of full-length TRAIL", *Cancer Gene Ther.* 9, 2: 164-172, (2002).
- Voigt, L. F., Deng, Q., and Weiss, N. S. "Recency, duration, and progestin content of oral contraceptives in relation to the incidence of endometrial cancer (Washington, USA)", *Cancer Causes Control* 5, 3: 227-233, (1994).
- Vucic, D., Franklin, M. C., Wallweber, H. J., Das, K., Eckelman, B. P., Shin, H., Elliott, L. O., Kadkhodayan, S., Deshayes, K., Salvesen, G. S., and Fairbrother, W. J. "Engineering ML-IAP to produce an extraordinarily potent caspase 9 inhibitor: implications for Smac-dependent anti-apoptotic activity of ML-IAP", *Biochem. J.* 385, Pt 1: 11-20, (2005).
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr. "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation", *Science* 281, 5383: 1680-1683, (1998a).
- Wang, C. Y., Mayo, M. W., Korneluk, R. G., Goeddel, D. V., and Baldwin, A. S., Jr. "NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation", *Science* 281, 5383: 1680-1683, (1998b).
- Wang, D. and Lippard, S. J. "Cellular processing of platinum anticancer drugs", *Nat. Rev. Drug Discov* 4, 4: 307-320, (2005).
- Wang, L., Zhang, G. M., and Feng, Z. H. "Down-regulation of survivin expression reversed multidrug resistance in adriamycin-resistant HL-60/ADR cell line", *Acta Pharmacol. Sin.* 24, 12: 1235-1240, (2003).
- Wang, T. H., Wang, H. S., and Soong, Y. K. "Paclitaxel-induced cell death: where the cell cycle and apoptosis come together", *Cancer* 88, 11: 2619-2628, (2000).
- Wang, Z., Xu, J., Zhou, J. Y., Liu, Y., and Wu, G. S. "Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance", *Cancer Res.* 66, 17: 8870-8877, (2006).

- Wani, M. C., Taylor, H. L., Wall, M. E., Coggon, P., and McPhail, A. T. "Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*", *J. Am. Chem. Soc.* 93, 9: 2325-2327, (1971).
- Weiderpass, E., Adami, H. O., Baron, J. A., Magnusson, C., Lindgren, A., and Persson, I. "Use of oral contraceptives and endometrial cancer risk (Sweden)", *Cancer Causes Control* 10, 4: 277-284, (1999).
- Weiderpass, E., Persson, I., Adami, H. O., Magnusson, C., Lindgren, A., and Baron, J. A. "Body size in different periods of life, diabetes mellitus, hypertension, and risk of postmenopausal endometrial cancer (Sweden)", *Cancer Causes Control* 11, 2: 185-192, (2000).
- Weng, L., Brown, J., and Eng, C. "PTEN induces apoptosis and cell cycle arrest through phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent and -independent pathways", *Human Mol. Genetics* 10, 3: 237-242, (2001).
- Whang, Y. E., Yuan, X. J., Liu, Y., Majumder, S., and Lewis, T. D. "Regulation of sensitivity to TRAIL by the PTEN tumor suppressor", *Vitam. Horm.* 67, 409-426, (2004).
- Wheatley, M. and Hawtin, S. R. "Glycosylation of G-protein-coupled receptors for hormones central to normal reproductive functioning: its occurrence and role", *Hum. Reprod. Update.* 5, 4: 356-364, (1999).
- White, E. "Life, death, and the pursuit of apoptosis", *Gene Dev.* 10, 1: 1-15, (1996).
- Wiener, J. R., Kerns, B. J., Harvey, E. L., Conaway, M. R., Iglehart, J. D., Berchuck, A., and Bast, R. C., Jr. "Overexpression of the protein tyrosine phosphatase PTP1B in human breast cancer: association with p185c-erbB-2 protein expression", *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 5: 372-378, (1994).
- Willis, S. N. and Adams, J. M. "Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis", *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 6: 617-625, (2005).
- Wishart, M. J. and Dixon, J. E. "PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease", *Trends Cell Biol.* 12, 12: 579-585, (2002).
- Wolf, B. B. and Green, D. R. "Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases", *J. Biol. Chem.* 274, 29: 20049-20052, (1999).
- Wu, C. J., O'Rourke, D. M., Feng, G. S., Johnson, G. R., Wang, Q., and Greene, M. I. "The tyrosine phosphatase SHP-2 is required for mediating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt activation by growth factors", *Oncogene* 20, 42: 6018-6025, (2001).

- Wu, X., Senechal, K., Neshat, M. S., Whang, Y. E., and Sawyers, C. L. "The PTEN/MMAC1 tumor suppressor phosphatase functions as a negative regulator of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 26: 15587-15591, (1998).
- Wyllie, A. H. "Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation", *Nature* 284, 5756: 555-556, (1980).
- Xia, H., Nho, R. S., Kahm, J., Kleidon, J., and Henke, C. A. "Focal adhesion kinase is upstream of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt in regulating fibroblast survival in response to contraction of type I collagen matrices via a beta 1 integrin viability signaling pathway", *J. Biol. Chem.* 279, 31: 33024-33034, (2004).
- Xie, Y., Massa, S. M., Ensslen-Craig, S. E., Major, D. L., Yang, T., Tisi, M. A., Derevyanny, V. D., Runge, W. O., Mehta, B. P., Moore, L. A., Brady-Kalnay, S. M., and Longo, F. M. "Protein-tyrosine phosphatase (PTP) wedge domain peptides: a novel approach for inhibition of PTP function and augmentation of protein-tyrosine kinase function", *J. Biol. Chem.* 281, 24: 16482-16492, (2006).
- Yaginuma, Y. and Westphal, H. "Analysis of the p53 gene in human uterine carcinoma cell lines", *Cancer Res.* 51, 24: 6506-6509, (1991).
- Yamaguchi, Y., Shiraki, K., Fuke, H., Inoue, T., Miyashita, K., Yamanaka, Y., Saitou, Y., Sugimoto, K., and Nakano, T. "Targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein or survivin by short interfering RNAs sensitize hepatoma cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand- and chemotherapeutic agent-induced cell death", *Oncol. Rep.* 14, 5: 1311-1316, (2005).
- Yan, X. J., Liang, L. Z., Zeng, Z. Y., Shi, Z., and Fu, L. W. "Effect of survivin shRNA on chemosensitivity of human ovarian cancer cell line OVCAR3 to paclitaxel", *Ai Zheng.* 25, 4: 398-403, (2006).
- Yang, E. and Korsmeyer, S. J. "Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death", *Blood* 88, 2: 386-401, (1996).
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M., and Ashwell, J. D. "Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli", *Science* 288, 5467: 874-877, (2000).
- Yoo, S. J., Huh, J. R., Muro, I., Yu, H., Wang, L., Wang, S. L., Feldman, R. M., Clem, R. J., Muller, H. A., and Hay, B. A. "Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms", *Nat. Cell Biol.* 4, 6: 416-424, (2002).
- Yoshida, H., Kong, Y. Y., Yoshida, R., Elia, A. J., Hakem, A., Hakem, R., Penninger, J. M., and Mak, T. W. "Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development", *Cell* 94, 6: 739-750, (1998).

- Yu, D., Liu, B., Tan, M., Li, J., Wang, S. S., and Hung, M. C. "Overexpression of c-erbB-2/neu in breast cancer cells confers increased resistance to Taxol via mdr-1-independent mechanisms", *Oncogene* 13, 6: 1359-1365, (1996).
- Yu, X., Rajala, R. V., McGinnis, J. F., Li, F., Anderson, R. E., Yan, X., Li, S., Elias, R. V., Knapp, R. R., Zhou, X., and Cao, W. "Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection", *J. Biol. Chem.* 279, 13: 13086-13094, (2004).
- Yuan, J. "Molecular control of life and death", *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 2: 211-214, (1995).
- Yuan, Z. Q., Feldman, R. I., Sussman, G. E., Coppola, D., Nicosia, S. V., and Cheng, J. Q. "AKT2 inhibition of cisplatin-induced JNK/p38 and Bax activation by phosphorylation of ASK1: implication of AKT2 in chemoresistance", *J. Biol. Chem.* 278, 26: 23432-23440, (2003).
- Zaleskis, G., Berleth, E., Verstovsek, S., Ehrke, M. J., and Mihich, E. "Doxorubicin-induced DNA degradation in murine thymocytes", *Mol. Pharmacol.* 46, 5: 901-908, (1994).
- Zangemeister-Wittke, U. and Simon, H. U. "An IAP in action: the multiple roles of survivin in differentiation, immunity and malignancy", *Cell Cycle* 3, 9: 1121-1123, (2004).
- Zhang, H. and Yee, D. "Is the type I insulin-like growth factor receptor a therapeutic target in endometrial cancer?", *Clin. Cancer Res.* 12, 21: 6323-6325, (2006).
- Zhao, R., Rabo, Y. B., Egyhazi, S., Andersson, A., Edgren, M. R., Linder, S., and Hansson, J. "Apoptosis and c-jun induction by cisplatin in a human melanoma cell line and a drug-resistant daughter cell line", *Anticancer Drugs* 6, 5: 657-668, (1995).
- Zhao, Y., You, H., Yang, Y., Wei, L., Zhang, X., Yao, L., Fan, D., and Yu, Q. "Distinctive regulation and function of PI 3K/Akt and MAPKs in doxorubicin-induced apoptosis of human lung adenocarcinoma cells", *J. Cell Biochem.* 91, 3: 621-632, (2004).
- Zhou, B. P. and Hung, M. C. "Novel targets of Akt, p21(Cipl/WAF1), and MDM2", *Semin. Oncol.* 29, 3 Suppl 11: 62-70, (2002).
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. "Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3", *Cell* 90, 3: 405-413, (1997).
- Zou, H., Li, Y., Liu, X., and Wang, X. "An APAF-1 cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9", *J. Biol. Chem.* 274, 17: 11549-11556, (1999).

Zvelebil, M. J., MacDougall, L., Leervers, S., Volinia, S., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Panayotou, G., Domin, J., Stein, R., and Pages, F. "Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351, 217-223, (1996).

ANNEXE I
BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL ESTROGEN-PLATINUM(II)
HYBRID MOLECULES ON UTERINE AND OVARIAN CANCERS –
MOLECULAR MODELING STUDIES

Cette annexe a été publiée dans "Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters",
2004, Vol. 14, 5919-5924

Biological evaluation of novel estrogen–platinum(II) hybrid molecules on uterine and ovarian cancers—molecular modeling studies

Véronique Gagnon,^a Marie-Ève St-Germain,^a Caroline Descôteaux,^a
Josée Provencher-Mandeville,^a Sophie Parent,^a Sanat K. Mandal,^b
Eric Asselin^a and Gervais Bérubé^{a,*}

^aDépartement de Chimie-Biologie, GRBCM, Université du Québec à Trois-Rivières, C.P. 500, Trois-Rivières, Québec, Canada G9A 5H7

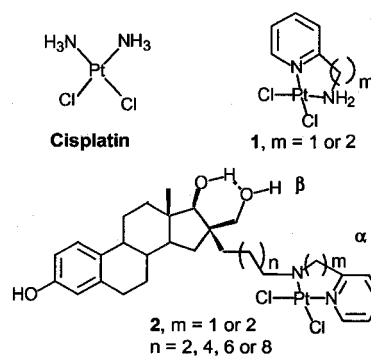
^bDivision of Science & Technology, College of the North Atlantic, Clarenville Campus, Clarenville, Newfoundland, Canada A5A 1V9

Received 12 July 2004; revised 4 September 2004; accepted 7 September 2004
Available online 28 September 2004

Abstract—We have recently reported the synthesis of a series of original 17 β -estradiol-linked platinum(II) hybrid molecules. The biological activity of these compounds was evaluated in vitro on estrogen dependent and independent (ER⁺ and ER[−]) human uterine and ovarian cancers. The hybrid molecules present higher affinity than that of 17 β -estradiol for the estrogen receptor alpha (ER α). The cytotoxicity and the affinity of the hybrid molecules are explained using molecular modeling analysis. This study further confirms that the derivatives made of a 2-(2'-aminoethyl)pyridine ligand displayed superior activity against the cell lines particularly when the connecting arm is 8–10 carbon atoms long. Molecular modeling shows that a long side chain can facilitate the access of the platinum(II) moiety to DNA. The novel compounds also prove to be moderately cytotoxic against platinum resistant endometrial and ovarian cancer cell lines.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cisplatin (*cis*-diamminedichloroplatinum(II)) is still a very useful anticancer agent that was discovered nearly 40 years ago (see Scheme 1).^{1,2} It has been mainly used for the treatment of solid tumors, particularly small cell lung, ovarian, testicular, head, and neck tumors. Recent literature reviews present a broad overview of the actual knowledge of platinum-based antitumor agents as well as their action mechanisms.^{3,4} The antitumor activity of platinum drugs is a consequence of their interaction with DNA. Cisplatin binds readily to the N7-position of guanine bases of DNA molecules thereby blocking replication and/or transcription, and ultimately inducing apoptosis.^{4,5} Three other platinum(II) drugs are presently on the market: carboplatin, oxaliplatin, and nedaplatin.³ However, oxaplatin and nedaplatin have not shown any distinct advantages over cisplatin and



Scheme 1. Structure of the platinum(II) complexes studied.

carboplatin. In general, the platinum-based drugs suffer from two main disadvantages: chemoresistance to the drugs can occur⁴ and they are nonselective toward cancer cells leading to severe toxic side effects, primarily kidney toxicity and neurotoxicity.⁵

Keywords: Estrogen–platinum(II) hybrids; Cytotoxic agents; Endometrial and ovarian cancers; Estrogen receptor; Molecular modeling.

* Corresponding author. Tel.: +1 81 9376 5011 3353; fax: +1 81 9376 5084; e-mail: gervais_berube@uqtr.ca

Drug targeting will be the key to improve selectivity of this type of drug. The aim of drug targeting is to deliver drugs only to those sites needing treatment. When this objective is met, not only will the efficacy of the treatment be improved, but toxic side effects will also be greatly minimized.

The estrogen receptor is a biological target that has attracted considerable attention over the years. It is expressed by several type of cancers; breast (60–70%),⁶ uterus (70–73%)⁷ as well as ovarian (61%).⁸ Together, they represent 40% of all cancers diagnosed in women and display a 25% mortality rate.⁹ The biological affinity between 17 β -estradiol and its cognate receptor can theoretically be used to direct a cytotoxic agent to the target cells. Consequently, over the years various estrogen-anticancer hybrids were investigated for the treatment of hormone-dependent cancers.^{10–17} It is noteworthy that the main prerequisite for targeting is a good receptor binding affinity (RBA) of the hybrid molecules.

In order to illustrate this type of targeted approach, only the most recent work will be presented herein. Doxorubicin was coupled to *E/Z*-4-hydroxytamoxifen via a tether link of various length.¹⁰ The lead derivative with a triethylene glycol tether show a RBA of 2.5% relative to *E/Z*-4-hydroxytamoxifen and inhibits the growth of four breast cancer cell lines with 4-fold up to 140-fold enhanced activity related to doxorubicin. Taxol was also successfully linked to estradiol through ester linkers. Unfortunately, the conjugates were in general less toxic than taxol itself.¹¹ However, one of the conjugates showed some selectivity for the ER α positive breast cancer cells; MCF-7.

The pioneering work of the following groups describing steroid-linked platinum(II) complexes must be cited. In this early work the platinum(II) group was attached to the estradiol skeleton either at the 3- or 17-hydroxyl position, which was unfavorable to receptor detection.^{12–14} Nowadays, the platinum moiety is attached in such a fashion that the hydroxyls groups of estradiol remain unaltered for optimal RBA. For example, platinum(II) and technetium(I) moieties were anchored to ethynylestradiol with success.¹⁵ The RBA values were disappointingly less than 1% possibly due to a partial protonation of the amino groups of the ligands at physiological pH as explained by the authors.¹⁵ Some earlier

work on ethynylestradiol yielded very interesting metal complexes associated to 2,6-bis-[(alkylthio)methyl]pyridine ligands with, in some cases, higher RBA than the free (uncomplexed) ligands.¹⁶ Several estrogen-tethered orally active platinum(IV) complexes were designed to release the toxic moiety by intracellular esterases.¹⁷ The reducing environment of the cell converts the platinum(IV) to platinum(II), in this case cisplatin itself. The design rationale was inspired by the observation that ER⁺ cells exposed to the hormone are sensitized to cisplatin.¹⁷

This manuscript presents a new family of 17 β -estradiol-platinum(II) molecules **2**, which are linked with an alkyl chain at position 16 α of the steroid nucleus and bear a 16 β -hydroxymethyl side chain. They are made from estrone in only five chemical steps.¹⁸

The objective of the present study was to determine the cytotoxic effect of these novel molecules using estrogen dependent (estrogen receptor positive; ER⁺) and independent (estrogen receptor negative; ER[−]) human uterine and ovarian cancer cells. The biological activity of these compounds was evaluated in vitro using an MTT cell proliferation assay.^{19,20} The MTT assay was performed over an incubation period of 72 h. The affinity for the estrogen receptor alpha (ER α) was also determined.

As shown by the MTT assays, the new Pt(II) complexes do not present any apparent specific toxicity toward ER⁺ uterine and ovarian cancer cells (Tables 1 and 2). The desired selectivity toward ER⁺ cancer cells might only be observed during the in vivo biological tests as noticed previously by other researchers. The reference derivatives **1** ($m = 1$ or 2) were generally less toxic than the estrogen–Pt(II) hybrid molecules particularly with **2**, $m = 2$ and $n = 6$ or 8 .²¹ The same observations were made previously with breast cancer cell lines.¹⁸ It was speculated that a large organic portion would enhance the cellular penetration of the membranes to the nucleus thus increasing cytotoxicity.¹⁸ The hybrids **2**, $m = 1$ are, in general, less toxic than those where $m = 2$. The length of the side chain seems to be optimal at $n = 6$ or 8 for both types of aminopyridine analogs ($m = 1$ or 2). The derivatives with short side chains ($n = 2$ or 4) are generally less toxic than cisplatin. The estrogen–Pt(II) hybrid molecules **2**, $m = 2$ and $n = 6$ or 8 are the most interest-

Table 1. Inhibitory concentration^a of cisplatin, **1** and **2** ($m = 1$) on both ER⁺ and ER[−] uterine and ovarian cancer cell lines

Cell lines	Type	ER	Cisplatin	1	2 , $n = 2$	2 , $n = 4$	2 , $n = 6$	2 , $n = 8$
HeLa	Uterus	−	3.6 \pm 0.2	13.0 \pm 3.1	NR	20.2 \pm 3.5	16.3 \pm 0.2	18.8 \pm 2.7
HEC-1A	Uterus	−	11.7 \pm 1.6	27.0 \pm 2.1	31.4 \pm 6.7	14.7 \pm 1.2	6.9 \pm 0.2	7.8 \pm 0.4
KLE	Uterus	−	12.5 \pm 2.8	NR	NR	21.6 \pm 4.2	12.8 \pm 2.0	9.0 \pm 2.0
RL-95-2	Uterus	+	10.3 \pm 0.9	31.0 \pm 2.5	15.6 \pm 0.9	10.9 \pm 1.9	5.7 \pm 1.4	9.7 \pm 0.8
Ishikawa	Uterus	+	7.9 \pm 0.7	25.2 \pm 2.9	32.5 \pm 0.0	19.7 \pm 1.9	16.3 \pm 1.9	12.2 \pm 1.6
A2780wt	Ovary	−	0.7 \pm 0.2	4.2	26.6 \pm 6.7	15.0 \pm 3.3	4.5 \pm 0.3	7.5 \pm 1.0
A2780cp	Ovary	−	6.5 \pm 3.3	NR	27.5 \pm 0.2	18.4 \pm 3.1	7.8 \pm 0.4	13.1 \pm 2.1
OVCAR-3	Ovary	+	2.5 \pm 0.1	29.0	36.3 \pm 2.2	NR	12.2 \pm 3.7	5.0 \pm 0.1
SKOV-3	Ovary	+	5.8 \pm 1.2	24.5	NR	NR	31.1 \pm 3.3	15.9 \pm 3.3

^a Inhibitory concentration (IC₅₀, μ M) as obtained by the MTT assay. Experiments were performed in duplicates and the results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. NR (not reached) = IC₅₀ > 40 μ M.

Table 2. Inhibitory concentration^a of cisplatin, 1 and 2 ($m = 2$) on both ER⁺ and ER[−] uterine and ovarian cancer cell lines

Cell lines	Type	ER	Cisplatin	1	2, $n = 2$	2, $n = 4$	2, $n = 6$	2, $n = 8$
HeLa	Uterus	−	3.6 ± 0.2	20.0 ± 2.5	10.8 ± 2.7	4.8 ± 0.1	2.3 ± 0.2	5.2 ± 1.7
HEC-1A	Uterus	−	11.7 ± 1.6	35.2 ± 0.2	8.8 ± 0.6	3.9 ± 0.5	1.7 ± 0.2	2.3 ± 0.8
KLE	Uterus	−	12.5 ± 2.8	NR	12.3 ± 3.4	6.0 ± 2.0	2.3 ± 0.3	3.5 ± 1.3
RL-95-2	Uterus	+	10.3 ± 0.9	30.9 ± 3.0	8.1 ± 0.5	3.3 ± 0.5	1.7 ± 0.2	2.7 ± 1.2
Ishikawa	Uterus	+	7.9 ± 0.7	29.8 ± 3.9	12.3 ± 2.2	2.8 ± 1.5	2.3 ± 0.3	3.3 ± 1.3
A2780wt	Ovary	−	0.7 ± 0.2	7.0	12.0 ± 3.7	3.3 ± 0.2	2.4 ± 0.5	1.7 ± 0.7
A2780cp	Ovary	−	6.5 ± 3.3	NR	18.9 ± 5.8	4.2 ± 0.2	2.7 ± 0.7	2.3 ± 0.6
OVCAR-3	Ovary	+	2.5 ± 0.1	25.0	27.3 ± 4.9	9.6 ± 3.6	3.0 ± 0.7	2.9 ± 0.8
SKOV-3	Ovary	+	5.8 ± 1.2	27.8	26.7 ± 4.6	8.1 ± 1.0	3.1 ± 1.0	5.2 ± 1.5

^a Inhibitory concentration (IC₅₀, μ M) as obtained by the MTT assay. Experiments were performed in duplicates and the results represent the mean \pm SEM of three independent experiments. NR (not reached) = IC₅₀ > 40 μ M.

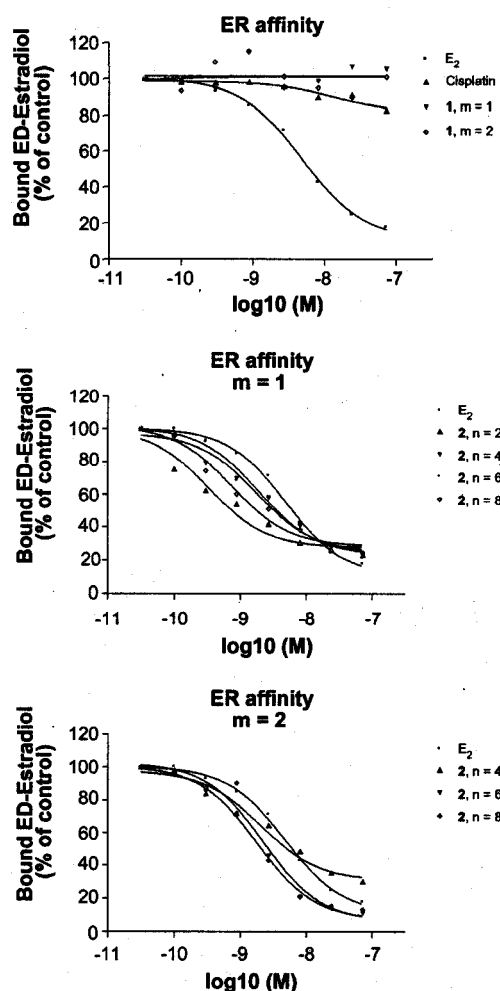


Figure 1. Estrogen receptor binding affinity (ER α) ED-estradiol: enzyme donor-estradiol; E₂: 17 β -estradiol. Cisplatin, 1 ($m = 1$ or 2) present no affinity for the ER.

ing derivative of the series. These hybrid molecules carry a 2-(2'-aminoethyl)pyridine ligand. They were either equivalent or up to ~ 7 times more efficient at killing cells when compared to the IC₅₀ of cisplatin. Interestingly, they are also active on the cisplatin resistant ovarian cancer A2780cp showing an IC₅₀ of 2.7 μ M (2, $m = 2$, $n = 6$) and 2.3 μ M (2, $m = 2$, $n = 8$) as compared to 6.5 μ M for cisplatin. Furthermore, they present activ-

ity on cisplatin resistant KLE endometrial cancer with an IC₅₀ of 2.3 and 3.5 μ M, respectively as compared to 12.5 μ M for cisplatin.²² Derivatives 2, $m = 2$ and $n = 6$ or 8 might become an alternative of choice for the treatment of such resistant endometrial and ovarian cancers.

The estrogen receptor alpha (ER α) affinity assay was performed using the HitHunterTM EFC Estrogen Fluorescence assay kit (Discoverx, Fremont, CA) according to manufacturer's instructions.²³

The estrogen receptor binding studies showed a strong affinity of these molecules to the estrogen receptor alpha (see Fig. 1). The reference derivatives, that is, cisplatin and 1 ($m = 1$ and $m = 2$) present, as expected, no affinity for the ER α . The estrogen-Pt(II) hybrid molecules have an IC₅₀ ranging from 0.33 to 2.26 nM compared to 4.79 nM for 17 β -estradiol, the natural ligand (Table 3). It has exceptionally high affinity. It is believed to be due to the presence of the 16 β -hydroxymethyl group allowing additional hydrogen bonding to the estrogen receptor. Molecular modeling studies confirm this hypothesis as described below.

Molecular modeling: All calculations (molecular mechanics, MM2) and modeling were performed on CACheWorkSystem Pro.²⁴ CD-38 (2, $m = 2$, $n = 8$) is one of the most cytotoxic derivatives in this series of

Table 3. Affinity for the estrogen receptor α (ER α)

Compounds	IC ₅₀ (nM)
17 β -Estradiol	4.79
Cisplatin	ND
1, $m = 1$	ND
1, $m = 2$	ND
<i>Hybrids, $m = 1$</i>	
2, $n = 2$ (CD-50)	0.33
2, $n = 4$	1.72
2, $n = 6$	1.86
2, $n = 8$	0.74
<i>Hybrids, $m = 2$</i>	
2, $n = 2$	NA
2, $n = 4$	2.05
2, $n = 6$	1.79
2, $n = 8$ (CD-38)	2.26

ND = not determined, NA = not available.

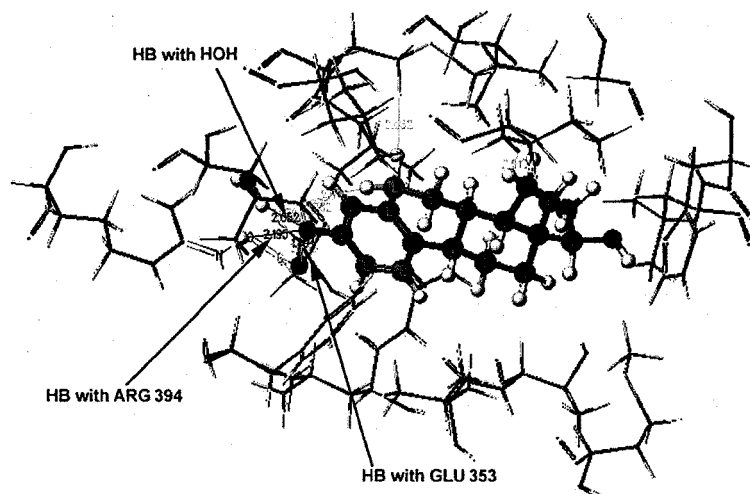


Figure 2. 17 β -Estradiol within the active site of the ER (PDB, 1ERE). The main interactions are occurring on ring A of the steroid nucleus, there are three hydrogen bonds (HB).

compounds. However, the affinity for the estrogen receptor (ER) of CD-50 ($2, m = 1, n = 2$) is much greater than all other derivatives, including 17 β -estradiol, the natural ligand. Surprisingly, CD-50 has significantly lower activity despite its excellent affinity for the ER. In order to understand such differences in cytotoxicity, CD-38 and CD-50 were docked into the active site of the estrogen receptor (PDB 1ERE).²⁵ According to 3D model based on X-ray structure of 17 β -estradiol bound to the estrogen receptor, the OH group at position 3 (steroid numbering) of all compounds form three hydrogen bonds of which two are with proteins, ARG 394 and GLU 353 and the other with a water molecule (Figs. 3 and 4, blue labels) in a comparable fashion to 17 β -estradiol itself (Fig. 2).

Both, CD-38 and CD-50 can readily form an intramolecular hydrogen bond (see Scheme 1, general structure

2). Interestingly, unlike 17 β -estradiol, CD-50 forms three additional hydrogen bonds of which two are intermolecular between HIS 524, LEU 525, and OH groups at 16- and 17-positions and one intramolecular hydrogen bond within OH groups at 16- and 17-positions of the estradiol part (Figs. 2 and 3). This is distinctly different from CD-38, which only forms three intermolecular hydrogen bonds like 17 β -estradiol and one intramolecular hydrogen bond between 16- and 17-hydroxy groups (Fig. 4). Since CD-50 forms additional hydrogen bonds, the binding energy will be much greater for CD-50 than for CD-38 or even for 17 β -estradiol, which explains its strong ER affinity. However, CD-38 is more potent than CD-50. To account for the difference in activity between CD-50 and CD-38, the steric hindrance (bumping atoms) between the ER and those molecules were evaluated (Fig. 5A and B yellow labels). As shown in Figure 5A and B, the yellow labels are far more intense for

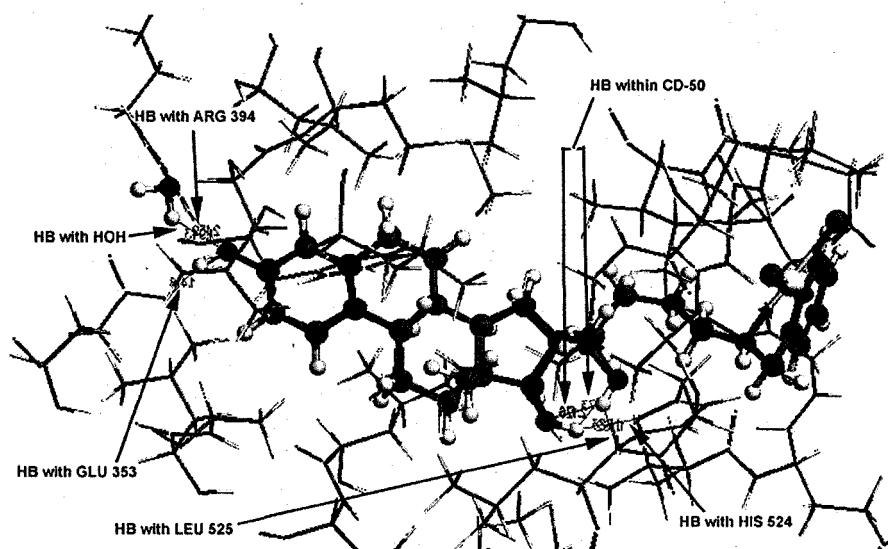


Figure 3. CD-50 in the active site showing additional HB, blue labels, when compared to CD-38 (Fig. 4) or 17 β -estradiol (Fig. 2). CD-50 presents seven HB.

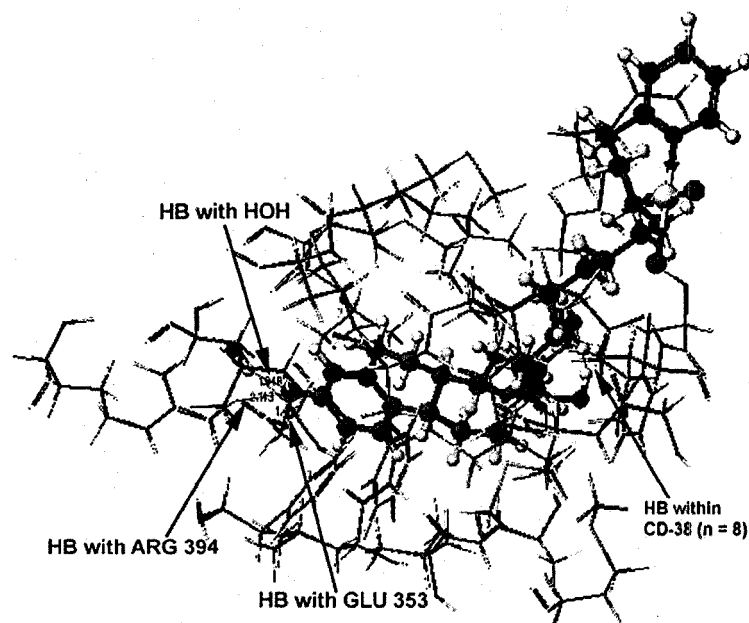


Figure 4. CD-38 in the active site of the ER. There are four HB.

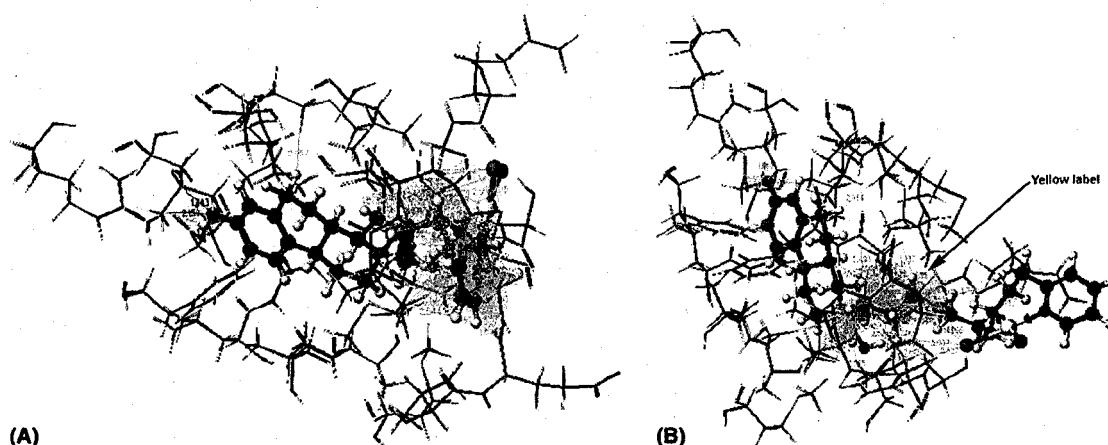


Figure 5. Surroundings of the platinum atom of CD-50 (left) and CD-38 (right) within the ER. The chlorine atoms (green) in CD-50 and CD-38 are pointing very differently. The platinum atom is more hindered for CD-50 than for CD-38 (yellow label) and thus unavailable for binding to DNA.

CD-50 than for CD-38. In CD-50, the platinum and the chlorine atoms are well buried within the ER site, the latter atoms are also pointing differently to those of CD-38 and, consequently, may not be freely available. This is not the case for CD-38; the chlorine atoms are much less crowded within the protein. In this case, they are readily available to be hydrolyzed and allow the platinum atom to bind to DNA and exert its cytotoxic activity.

In summary, this manuscript presents a series of cytotoxic 17β -estradiol–Pt(II) hybrid molecules. They are readily available from estrone in only five chemical steps with excellent yields (28% overall).¹⁸ They present higher affinity than that of 17β -estradiol for the ER α . The affinity of the hybrid molecules was explained using molecular modeling analysis that shows additional hydrogen bonds with the ER taking place on ring D

of the steroid nucleus when compared with 17β -estradiol. Furthermore, molecular modeling demonstrates that a long side chain facilitates the access of the platinum(II) moiety to DNA, accounting for the cytotoxic activity of the 17β -estradiol–Pt(II) molecules. The hybrids 2, $m = 2$ and $n = 6$ or 8 also proved to be moderately cytotoxic against platinum resistant endometrial and ovarian cancer cell lines. These two hybrids have a remarkably high affinity that is likely to lead the cytotoxic Pt(II) moiety to the ER α -expressing target cells in an in vivo study that will be performed in the near future.

Acknowledgements

This work was supported by the Université du Québec à Trois-Rivières, NSERC doctoral scholarship to V.G.

and summer grants to C.D. and J.P.-M., FRSQ and CIHR (MOP-66987) to E. Asselin.

References and notes

1. Kelland, L. R.; Farrell, N. P. *Platinum-Based Drugs in Cancer Therapy*; Humana: Totowa, New Jersey, 2000.
2. Rosenberg, B.; Van Camp, L.; Krigas, T. *Nature* **1965**, *205*, 698.
3. Wong, E.; Giandomenico, C. M. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2451.
4. Jamieson, E. R.; Lippard, S. J. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2467.
5. (a) Reedijk, J. *Inorg. Chim. Acta* **1992**, *198*, 873; (b) Lemaire, D.; Fouchet, M.-H.; Kozelka, J. *J. Inorg. Biochem.* **1994**, *53*, 261; (c) Hydes, P. C.; Russell, M. J. H. *Cancer Metast. Rev.* **1988**, *7*, 67.
6. von Angerer, E. In *Metal Complexes in Cancer Chemotherapy*; Keppler, S., Ed.; VCH: Weinheim, 1993; pp 75–83.
7. Kounelis, S.; Kapranos, N.; Kouri, E.; Coppola, D.; Papadaki, H.; Jones, M. W. *Mod. Pathol.* **2000**, *13*, 379.
8. Rao, B. R.; Slotman, B. J. *Endocr. Rev.* **1991**, *12*, 14.
9. Canadian Cancer Society, Statistics for 2004 at www.cancer.ca.
10. Burke, P. J.; Koch, T. H. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 1193.
11. Liu, C.; Strobl, J. S.; Bane, S.; Schilling, J. K.; McCracken, M.; Chatterjee, S. K.; Rabim-Bata, R.; Kingston, D. G. I. *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 152.
12. Georgiadis, M. P.; Haroutounian, S. A. *Inorg. Chim. Acta* **1987**, *138*, 249.
13. Gandolfi, O.; Blum, J.; Mandelbaum-Shavit, F. *Inorg. Chim. Acta* **1984**, *91*, 257.
14. Altman, J.; Castrillo, T.; Beck, W.; Bernhardt, G.; Schonenberger, H. *Inorg. Chem.* **1991**, *30*, 4085.
15. Cassino, C.; Gabano, E.; Ravera, M.; Cravotto, G.; Palmisano, G.; Vessière, A.; Jaouen, G.; Mundwiler, S.; Alberto, R.; Osella, D. *Inorg. Chim. Acta* **2004**, *357*, 2157.
16. Jackson, A.; Davis, J.; Pither, R. J.; Rodger, A.; Hannon, M. J. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3964, and reference cited therein.
17. Barnes, R. K.; Kutikov, A.; Lippard, S. J. *J. Chem. Biol.* **2004**, *11*, 557.
18. Descôteaux, C.; Provencher-Mandeville, J.; Mathieu, I.; Perron, V.; Mandal, S. K.; Asselin, E.; Bérubé, G. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3927, and reference cited therein.
19. Carmichael, J.; DeGrapp, W. G.; Gazdar, A. F.; Minna, J. D.; Mitchell, J. B. *Cancer Res.* **1987**, *47*, 943.
20. Ford, C. H. J.; Richardson, V. J.; Tsaltas, G. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **1989**, *24*, 295.
21. Al-Allaf, T.; Castan, P.; Turpin, R.; Wimmer, S. *C. R. Acad. Sci.* **1992**, *314*, 1029.
22. Gagnon, V.; Mathieu, I.; Sexton, É.; Leblanc, K.; Asselin, E. AKT involvement in cisplatin chemoresistance of human uterine cancer cells. *Gynecol. Oncol.* **2004**, *94*, 785.
23. The HitHunter™ EFC Estrogen Fluorescence assay kit was obtained from Discoverx, Fremont, CA (<http://www.discoverx.com>).
24. CACheWorkSystem Pro, Fujitsu, USA, 2003.
25. <http://www.rcsb.org/pdb/>.